

UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARANÁ

CAROLINE GRISBACH

**POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE *FCN2*  
NA POPULAÇÃO EURO-BRASILEIRA**

Curitiba

2011

CAROLINE GRISBACH

**POLIMORFISMOS DO PROMOTOR DE *FCN2*  
NA POPULAÇÃO EURO-BRASILEIRA**

Monografia apresentada à disciplina de Estágio II, do departamento de Genética, como requisito parcial para o título de bacharel no curso de Ciências Biológicas, Setor de Ciências Biológicas, da Universidade Federal do Paraná.

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Petzl-Erler

Co-orientadoras: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iara José Taborda de  
Messias-Reason

Dr<sup>a</sup>. Angelica Beate Winter Boldt

CURITIBA

2011

## **AGRADECIMENTOS**

A minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Maria Luiza Petzl-Erler pela oportunidade de realização e contribuição neste trabalho de conclusão de curso.

As minhas co-orientadoras Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Iara J. T. de Messias-Reason e Dr<sup>a</sup>. Angelica B. W. Boldt pelo imenso apoio, confiança, incentivo e pelos ensinamentos durante toda a elaboração deste trabalho, além de terem-me proporcionado a grande oportunidade de fazer parte da equipe do Laboratório de Imunopatologia Molecular.

A minha família e familiares pelo carinho, incentivo, apoio e grande companheirismo que muito contribuiu para a escrita deste trabalho e para meu bem-estar.

Aos meus grandes amigos que fiz durante a graduação, em especial a Ingrid, Kamilla, Leandro, Carlos Eduardo, Juliana F., Juliana V., Priscila, Carine, Gabriel, Renata, Juliane, Vanessa, Flávio, Débora, Aline, Eduardo, Elisa, Eliane, Rafael e João.

A maravilhosa equipe do Laboratório de Imunopatologia, pelas contribuições, auxílios, amizade, companheirismo e apoio. Em especial, a Paola, Andressa, Renato e Stefanie pela contribuição direta na realização deste trabalho.

As pessoas que são muito especiais para mim, Milena, Rafaella, Danielle, Francielle, Blondy, Flávia, Amanda, Jaqueline, Súelen e Matheus pela grande amizade, apoio, conforto, incentivo e companheirismo.

Aos meus ex-orientadores que muito contribuíram para meu crescimento profissional, Prof<sup>o</sup>. Dr<sup>o</sup>. Luiz Claudio Fernandes, Dr<sup>a</sup>. Katya Naliwaiko, Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ruth J. G. Schadeck e Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia H. Mendonça.

Ao meu querido Pai Celestial, por ter me proporcionado muita força, apoio, conforto e bênçãos, durante toda a elaboração deste trabalho e em todos os momentos da minha vida.

## RESUMO

A via das lectinas do sistema complemento é ativada pela proteólise das serinas proteases (MASPs) associadas à lectina ligante de manose (MBL) ou às ficolinas (Ficolina-1, Ficolina-2 e Ficolina-3). De acordo com estudos recentes, a proteína sérica ficolina-2 apresenta polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) na região promotora, os quais estão associados a reduções nos níveis de expressão do gene e diminuição da ativação do sistema complemento ou da eficiência fagocítica. Neste trabalho, otimizou-se a técnica de PCR sequência-específica (PCR-SSP) para a identificação dos SNPs -986, -602 e -4 da região promotora de *FCN2* em uma amostra de 139 euro-brasileiros e analisou-se a evolução molecular deste polimorfismo através dos dados obtidos previamente pelo sequenciamento de outros 137 euro-brasileiros. A técnica foi otimizada com sucesso por meio de duas PCRs-SSP biespecíficas, havendo 100% de concordância com os dados de sequenciamento em 12 controles cegos. A distribuição genotípica está em equilíbrio de Hardy e Weinberg, sendo que os haplótipos encontrados, GGA (48,6%), AGG (24,1%), AAA (21,2%) e AGA (6,1%) não diferem significativamente das frequências de populações europeias encontradas na literatura. O desequilíbrio de ligação foi verificado para todas as combinações de *loci*, sendo que não foram encontradas as combinações -986\*G/-602\*A, -986\*G/-4\*G e -602\*A/-4\*G. As regiões de maior diversidade nucleotídica foram identificadas em torno das posições dos SNPs -986 ( $P_i=0,00501$ ), -602 ( $P_i=0,00499$ ) e -4 ( $P_i=0,00568$ ). A hipótese de neutralidade seletiva foi rejeitada na comparação com um grupo externo com  $H$  de Fay e Wu igual a -3,6067 ( $p<0,01$ ). A árvore filogenética apresenta dois clados distintos, um mais antigo, constituído de haplótipos -986/-602/-4 associados a baixos níveis séricos, outro mais recente, contendo haplótipos 986/-602/-4 associados a altos níveis séricos de ficolina-2. Excluindo-se os haplótipos duvidosos, foi possível inferir os passos mutacionais entre os haplótipos em questão. Segundo o teste WSRT (*Wilcoxon Signed Rank Test*), houve desvio da média de 8.000 ng/ml das concentrações de ficolina-2 associadas aos genótipos GGA ( $p=0,008$ ), RGR ( $p=0,016$ ) e RRA ( $p=0,031$ ), o que é esperado conforme a literatura. Comparada com a técnica de sequenciamento, a PCR-SSP biespecífica foi considerada igualmente confiável e muito mais rápida e econômica, apresentando a vantagem adicional de permitir a haplotipagem física dos SNPs investigados. De fato, por meio dos resultados da PCR-SSP, identificaram-se prováveis erros gerados pela reconstrução de haplótipos com o algoritmo ELB. Com base na análise filogenética, sugere-se que concentrações baixas de ficolina-2 representam o fenótipo mais antigo de *FCN2* na espécie humana. Já os resultados dos testes de neutralidade seletiva levam-nos a sugerir que o efeito carona pode ter ocorrido por seleção positiva dos SNPs -986\*G>A, -602\*G>A e -4\*A>G, associados a altas concentrações de ficolina-2, ou através da expansão demográfica da população humana.

## ABSTRACT

The lectin pathway of complement is initiated by proteolytic activity of serine proteases (MASPs) associated with mannose binding lectin (MBL) or ficolins (Ficolin-1, Ficolin-2 and Ficolin-3). According to recent studies, the serum protein ficolin-2 (or ficolin-L) presents single nucleotide polymorphisms (SNPs) in the promoter region related to low gene expression which results in a decrease of complement system activation or phagocytic efficiency. In this work, a sequence-specific primer PCR (SSP-PCR) was optimized for the -986G>A, -602G>A and -4A>G SNPs from the promoter region of *FCN2* gene in 139 euro-brazilians and molecular evolution analysis of these polymorphisms were done with sequencing data of another 137 euro-brazilians. Two reactions of a bispecific SSP-PCR were successfully optimized reaching a 100% concordance rate for 12 sequenced blind controls. The genotypic distribution was in Hardy-Weinberg equilibrium, and there is no significant differences between the haplotype frequencies identified by PCR-SSP, which are GGA (48,6%), AGG (24,1%), AGG (24,1%) and AGA (6,1%), and the european population data. The linkage disequilibrium was observed for all *loci* combination, and the -986\*G/-602\*A, -986\*G/-4\*G e -602\*A/-4\*G haplotypes were not found. The nucleotide diversity was higher around the -986 ( $P_i=0,00501$ ), -602 ( $P_i=0,00499$ ) and -4 ( $P_i=0,00568$ ) SNPs positions. The selective neutrality hypothesis was rejected in the comparison between intraspecific sequences and an outgroup with a Fay and Wu's  $H$  equal to -3,6067 ( $p<0,01$ ). The phylogenetic tree presents two distincts clades, one more ancient, containing -986/-602/-4 haplotypes associated with lower serum levels of ficolin-2, and a more recent one, formed by -986/-602/-4 haplotypes associated with higher serum levels. The mutational steps could be inferred when the doubtful -986/-602/-4 haplotypes were excluded. According to Wilcoxon Signed Rank Test (WSRT), a deviation from the 8.000 ng/ml average was observed between the ficolin-2 concentrations and the GGA ( $p=0,008$ ), RGR ( $p=0,016$ ) and RRA ( $p=0,031$ ) genotypes, which was already described in literature. The bispecific SSP-PCR was considered as reliable as the sequencing technique, nevertheless its major advantages are speed, economy and physical haplotyping capacity. The SSP-PCR genotyping results identified possible errors on haplotype reconstruction generated by ELB algorithm. Based on phylogenetic analysis, it is suggested that lower concentrations of ficolin-2 are the most ancient phenotype of *FCN2* gene in human species. Furthermore, the results of neutrality tests suggest that the hitchhiking effect possible occurred by positive selection of -986\*G>A, -602\*G>A e -4\*A>G SNPs, which are associated with high concentrations of ficolin-2, or by demographic expansion of human population.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 –	VIAS DE ATIVAÇÃO DO SISTEMA COMPLEMENTO.....	15
FIGURA 2 –	ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS FICOLINAS.....	16
FIGURA 3 –	GENE <i>FCN2</i> E SUA REGIÃO PROMOTORA.....	17
FIGURA 4 –	DESAPARECIMENTO GRADUAL DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO.....	20
FIGURA 5 –	ACOPLAMENTO DOS INICIADORES EM UMA PCR BIESPECÍFICA....	25
FIGURA 6 –	REGIÕES DE ACOPLAMENTO DOS INICIADORES NA PCR-SSP DO GENE <i>FCN2</i> .....	26
FIGURA 7 –	GEL DE ELETROFORESE DA AMPLIFICAÇÃO DO <i>PROM13</i> .....	30
FIGURA 8 –	GEL DE ELETROFORESE DA AMPLIFICAÇÃO DO <i>PROM12</i> .....	31
FIGURA 9 –	GEL DE ELETROFORESE DA AMPLIFICAÇÃO DO <i>PROM23</i> .....	31
FIGURA 10 –	DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS <i>LOC1</i> -986, -602 e -4.....	35
GRÁFICO 1 –	FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS <i>LOC1</i> -986 E -602.....	36
GRÁFICO 2 –	FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS <i>LOC1</i> -986 E -4.....	36
GRÁFICO 3 –	FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS <i>LOC1</i> -602 E -4.....	37
GRÁFICO 4 –	DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA DO PROMOTOR E DA PORÇÃO INICIAL DO EXON 1 DO GENE <i>FCN2</i> SEM GRUPO EXTERNO.....	38

GRÁFICO 5 –	TESTE <i>F</i> DE FU E LI PARA O PROMOTOR E PORÇÃO INICIAL DO EXON 1 DO GENE <i>FCN2</i> SEM GRUPO EXTERNO.....	39
GRÁFICO 6 –	TESTE <i>D</i> DE TAJIMA PARA O PROMOTOR E PORÇÃO INICIAL DO EXON 1 DO GENE <i>FCN2</i> SEM GRUPO EXTERNO.....	39
GRÁFICO 7 –	TESTE <i>F</i> DE FU E LI PARA O PROMOTOR E PORÇÃO INICIAL DO EXON 1 DO GENE <i>FCN2</i> COM GRUPO EXTERNO.....	41
GRÁFICO 8 –	TESTE <i>H</i> DE FAY E WU PARA O PROMOTOR E PORÇÃO INICIAL DO EXON 1 DO GENE <i>FCN2</i> COM GRUPO EXTERNO.....	41
FIGURA 11 –	PASSOS MUTACIONAIS DO HAPLÓTIPO -986/-602/-4 .....	44
FIGURA 12 –	ÁRVORE FILOGENÉTICA E MUDANÇAS NUCLEOTÍDICAS DO PROMOTOR E PARTE INICIAL DO EXON 1 DO GENE <i>FCN2</i> .....	45
GRÁFICO 9 –	GENÓTIPOS -986/-602/-4 <i>VERSUS</i> CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2.....	45

## LISTA DE TABELAS

TABELA 1 –	SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS.....	27
TABELA 2 –	FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO PROMOTOR DE <i>FCN2</i> (EURO-BRASILEIROS).....	32
TABELA 3 –	FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DO PROMOTOR DE <i>FCN2</i> (EURO-BRASILEIROS).....	33
TABELA 4 –	FREQUÊNCIA ALÉLICA DO PROMOTOR DE <i>FCN2</i> (EURO-BRASILEIROS).....	34
TABELA 5 –	DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (%) DOS SNPS DO PROMOTOR DO GENE <i>FCN2</i> .....	34
TABELA 6 –	EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG PARA O GENÓTIPO COMPLETO DO PROMOTOR DE <i>FCN2</i> (EURO-BRASILEIROS).....	35
TABELA 7 –	NEUTRALIDADE SELETIVA E DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA SEM GRUPO EXTERNO.....	38
TABELA 8 –	NEUTRALIDADE SELETIVA E DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA COM GRUPO EXTERNO ( <i>Pan troglodytes</i> ).....	40



## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO .....	11
1.1 OBJETIVOS .....	12
1.1.1 Objetivo geral .....	12
1.1.2 Objetivos específicos.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	14
2.1 SISTEMA COMPLEMENTO.....	14
2.1.1 Ficolinas .....	15
2.2 GENÉTICA DE POPULAÇÕES HUMANAS.....	18
2.2.1 Variação genética.....	18
2.2.1.1 Equilíbrio de Hardy e Weinberg.....	18
2.2.1.2 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) .....	18
2.2.1.3 Diversidade nucleotídica (Pi) .....	19
2.2.1.3 Ligação e desequilíbrio de ligação .....	19
2.2.2 Evolução molecular .....	21
2.2.2.1 Neutralidade seletiva .....	21
2.2.2.2 Filogenética molecular.....	23
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	24
3.1 CASUÍSTICA.....	24
3.2 COLETA.....	24
3.3 EXTRAÇÃO DE DNA .....	25
3.4 PCR-SSP .....	25
3.4.1 PCR-SSP <i>FCN2</i> .....	26
3.5 ENSAIOS DE IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA (ELISA) .....	28
3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA E FILOGENÉTICA.....	28
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	30
4.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR-SSP <i>FCN2</i> .....	30
4.1.1 Tipagem -986/-4.....	30
4.1.2 Tipagens -986/-602 e -602/-4.....	30
4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA E FILOGENÉTICA.....	32
4.2.1 Frequência genotípica, haplotípica e alélica.....	32
4.2.2 Equilíbrio de Hardy e Weinberg.....	35

4.2.3 Desequilíbrio de ligação .....	35
4.2.4 Blast .....	37
4.2.5 Neutralidade seletiva .....	37
4.2.6 Filogenética molecular.....	42
4.2.6.1 Árvore Filogenética.....	42
4.2.7 Correlação genótipo <i>versus</i> fenótipo de <i>FCN2</i> .....	43
5 CONCLUSÕES .....	46
REFERÊNCIAS.....	47
ANEXOS .....	52

## 1 INTRODUÇÃO

O sistema complemento compreende um dos principais mecanismos efetores da imunidade humoral e inata atuando na opsonização, fagocitose e destruição de patógenos (ENDO *et al.*, 2007). As ficolinas são proteínas séricas envolvidas no reconhecimento de patógenos e participam na ativação do sistema complemento através da via das lectinas. A proteína ficolina-2 (ou ficolina-L), codificada pelo gene *FCN2*, é expressa principalmente no fígado e apresenta polimorfismos na região promotora associados a variações nos seus níveis séricos. Os três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) das posições -986, -602 e -4 situados no promotor estão fortemente associados a estas variações (HUMMELSHØJ *et al.*, 2005; CEDZYNSKI *et al.*, 2007). Porém, há outros polimorfismos situados na região codificadora associados com a modificação da capacidade de ligação ao sítio-alvo (HUMMELSHØJ *et al.*, 2005; HERPES *et al.*, 2006). Alguns estudos associam baixos níveis de ficolina-2 com fenótipos clínicos de algumas doenças, tais como infecções respiratórias, nefropatias por IgA e artrite reumatóide (ENDO *et al.*, 2007; HUMMELSHØJ *et al.*, 2005; MUNTHER-FOG *et al.*, 2007; GARRED *et al.*, 2009).

Os métodos clássicos de genotipagem de SNPs são baseados na reação em cadeia da polimerase (PCR), tais como as PCR convencionais sequência-específica (SSP) e de sondas com oligonucleotídeos sequência-específicos (SSOP); além das variações mais complexas como PCR em tempo real (qRT-PCR), o sequenciamento e o pirosequenciamento. Embora as técnicas mais complexas tenham padrão ouro frente às técnicas de PCR convencionais, estas apresentam certas desvantagens como alto custo e impossibilidade de identificação da fase gamética. Dessa forma, a otimização de PCR-SSP para o gene *FCN2*, poderá contribuir tanto para validar resultados obtidos por sequenciamento quanto para constituir método de genotipagem rápido e de baixo custo passível de aplicação em pesquisas e/ou rotina em laboratórios de diagnóstico, substituindo técnicas mais onerosas e demoradas.

O estudo da biologia evolutiva dos polimorfismos genéticos pode ser utilizado para realizar inferências sobre a história e os processos evolutivos em subpopulações de uma mesma espécie ou em análises interespecíficas. Os

organismos que tenham uma ancestralidade compartilhada geralmente possuem sequência de genes similares. Dessa forma, a similaridade entre as sequências pode proporcionar a inferência da relação ancestral entre um grupo de organismos, caracterizando a filogenia molecular. Adicionalmente, as taxas e padrões de mudança na sequência dentro e entre espécies relacionadas podem indicar a atuação de forças evolutivas (HARTL; CLARK, 2010).

Do ponto de vista prático, os polimorfismos genéticos também podem ser utilizados como marcadores genéticos de susceptibilidade a doenças, permitindo a identificação dos genes envolvidos e de suas respectivas funções no desenvolvimento da doença. Além disso, podem ser úteis como indicadores de prognóstico de doenças, contribuindo favoravelmente para o desenvolvimento e escolha de tratamentos mais efetivos.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo geral

No presente estudo, pretende-se identificar três polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) da região promotora do gene da ficolina-2 (*FCN2*) em 139 euro-brasileiros, com a finalidade de analisar a evolução dos polimorfismos do promotor de *FCN2* e disponibilizar a amostra como grupo controle para futuros estudos de associações com doenças relacionadas a distúrbios do sistema complemento.

### 1.1.2 Objetivos específicos

- Realizar coleta de sangue e extração de DNA de 74 euro-brasileiros, adultos e saudáveis,
- Otimizar método de haplotipagem dos SNPs -986G>A, -602G>A e -4A>G, situados na região promotora de *FCN2*, através de amplificação sequencia-específica (PCR-SSP),
- Determinar os genótipos e haplótipos dos SNPs -986G>A, -602G>A e -4A>G do promotor de *FCN2* presentes na população euro-brasileira estudada,

- Verificar se a distribuição genotípica dos SNPs investigados pela PCR-SSP está em conformidade com o equilíbrio de Hardy e Weinberg,
- Comparar as frequências alélicas e haplotípicas obtidas dos SNPs investigados pela PCR-SSP com as relatadas para outras populações,
- Verificar a hipótese de equilíbrio de ligação entre os SNPs investigados pela PCR-SSP,
- Verificar a hipótese de neutralidade seletiva em uma amostra de 137 euro-brasileiros previamente sequenciada para o promotor e porção inicial do exon 1 de *FCN2*,
- Verificar e correlacionar a concentração plasmática da proteína ficolina-2 em uma amostra de 40 euro-brasileiros com diferentes genótipos, previamente sequenciados para o promotor e porção inicial do exon 1 do gene *FCN2*,
- Analisar a evolução molecular dos SNPs situados no promotor e porção inicial do exon 1 do gene *FCN2* em uma amostra de 137 euro-brasileiros previamente sequenciada para esta região,
- Formar um grupo controle de 139 euro-brasileiros para futuros estudos de associação com doenças relacionadas ao distúrbios do sistema complemento.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 SISTEMA COMPLEMENTO

O sistema complemento compõe um dos principais mecanismos da resposta imune inata contra agentes infecciosos e, além disso, é um importante efetor da imunidade mediada por anticorpos. Nele, estão presentes mais de 35 proteínas plasmáticas e de superfície celular capazes de reconhecer patógenos; diferenciar tecidos saudáveis, restos celulares e células apoptóticas; e atuar na manutenção da homeostase (BOLDT; GOELDNER; MESSIAS-REASON, 2011, aceito para publicação). Este reconhecimento é realizado por proteínas potencialmente inativas que se tornam ativadas de forma estável após sua ligação à padrões moleculares associados a patógenos ou à constituintes celulares alterados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

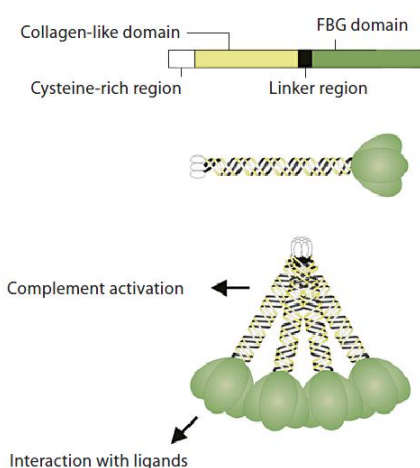
O processo de ativação do sistema complemento compreende três vias: clássica, alternativa e das lectinas (Figura 1). A via clássica inicia-se pela ligação de C1q na superfície de bactérias, na proteína C reativa ou em complexos antígeno-anticorpo (MURPHY *et al.*, 2010a). A via alternativa é ativada pela hidrólise espontânea de C3 ou pelo reconhecimento de padrões pela properdina (GARRED *et al.*, 2009). A via das lectinas, descrita recentemente, é iniciada pela atividade proteolítica desencadeada pelas serinas proteases (MASPs) associadas à lectina ligante de manose (MBL) ou às ficolinas (Ficolina-1, Ficolina-2 e Ficolina-3), as quais reconhecem padrões de açúcares presentes nos patógenos. Após a ativação da via das lectinas, MASP-2 cliva C4 e C2 em C4b2b, formando a enzima C3 convertase. Por outro lado, MASP-1 pode clivar C3 diretamente e levar à ativação da via alternativa (FUJITA, 2002; GARRED *et al.*, 2009). A cascata proteolítica desencadeada pelo processo de ativação permitirá uma grande amplificação e rapidez da resposta imune inata, pois cada ativação de um elemento pré-formado pode gerar, rapidamente, múltiplas enzimas e complexos enzimáticos ativados (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2008).

Uma vez ativado o sistema complemento por qualquer uma dessas vias, produtos da clivagem sequencial C3, C4 e C5 são capazes de promover múltiplos efeitos biológicos. As anafilatoxinas C3a e C5a são potentes mediadores inflamatórios, causando contração da musculatura lisa e degranulação de basófilos e



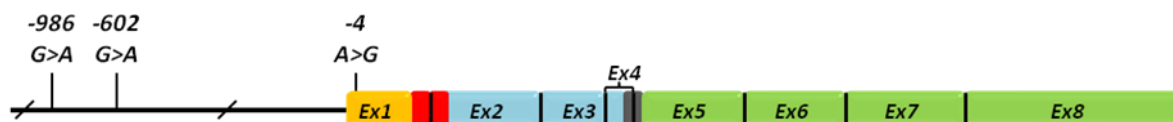
vez que se estende a grupos acetilados em geral, tais como moléculas de ácidos lipoteóico (LTA) – constituinte da parede celular de bactérias Gram positivas, peptideoglicanos (PG), além de lipopolissacarídeos presentes na superfície de bactérias Gram negativas,  $\beta$ -1,3-glucanos em fungos e glicoconjugados constituintes do envelope do vírus influenza A. Outros possíveis ligantes incluem elastina, corticosteróides e DNA (CEDZYNSKI *et al.*, 2007). Além disso, a ficolina-2 tem a capacidade de interagir com a proteína C reativa, estabilizando a ligação com bactérias e ativando a via das lectinas sobre condições inflamatórias (baixos níveis de cálcio e pH) (NG *et al.*, 2007).

As ficolinas são proteínas multiméricas constituídas por quatro ou mais subunidades unidas por pontes de dissulfeto (Figura 2) (GARRED *et al.*, 2010). Sua estrutura é composta por um domínio N-terminal constituído de resíduos de cisteína; domínio semelhante ao colágeno contendo repetições Gly-Xaa-Xaa (onde X é qualquer aminoácido); e um domínio C-terminal, conhecido como região semelhante ao fibrinogênio (FBG). O domínio semelhante ao colágeno é responsável pelas interações com as MASPs, as quais compõem importante via de ativação do sistema complemento. Já o arranjo polar presente no domínio FBG compõe a região de reconhecimento dos grupos acetilados presentes em carboidratos (GARRED *et al.*, 2009).



**FIGURA 2 – ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL DAS FICOLINAS**  
 FONTE: GARRED *et al.*, 2010





**FIGURA 3 - GENE *FCN2* E SUA REGIÃO PROMOTORA**

FONTE: O autor (2011)

NOTA: As áreas coloridas correspondem às regiões codificadoras do peptídeo sinal (em amarelo), da região rica em cisteína (em vermelho), do domínio semelhante ao colágeno (em azul), da região do pescoço (em cinza) e do domínio semelhante ao fibrinogênio (em verde) da proteína ficolina-2.

LEGENDA: A região promotora do gene *FCN2*, contendo os SNPs -986 G>A, -602 G>A e -4 A>G, está identificada pela linha preta horizontal; os introns estão demonstrados pelas linhas verticais; Ex – exon.

O gene codificante da ficolina-2 localiza-se no braço longo do cromossomo 9 (9q34) e contém oito exons (Figura 3). A variação da concentração sérica de ficolina-2 está relacionada com a presença de três polimorfismos (-986, -602, -4, contados a partir do sítio de início da transcrição) na região promotora deste gene (HUMMELSHØJ *et al.*, 2005; CEDZYNSKI *et al.*, 2007; MESSIAS-REASON *et al.*, 2009a), enquanto que os polimorfismos na porção estrutural do gene influenciam sua afinidade por diferentes carboidratos acetilados (MUNTHE-FOG *et al.*, 2007). Para a região promotora, os SNPs são: -986G>A (dbSNP rs3124952), -602G>A (dbSNP rs3124953) e -4A>G (dbSNP rs17514136) (HUMMELSHØJ *et al.*, 2005). Baseando-se em pesquisas atuais, os haplótipos -986, -602, -4 mais comuns são: GGA, AAA, AGG e AGA (MUNTHE-FOG *et al.*, 2007; MESSIAS-REASON *et al.*, 2009). Além disso, estudos recentes revelam que a presença do nucleotídeo adenina (A) nas posições -986 e -602 e de guanina (G) na posição -4 está associada a altas concentrações de ficolina-2 no soro de maneira aditiva (MUNTHE-FOG *et al.*, 2007). Dessa forma, os haplótipos AAA e AGG estão associados a altos níveis séricos de ficolina-2, AGA está associado a concentrações intermediárias e o haplótipo GGA está associado a baixos níveis séricos da mesma (MUNTHE-FOG *et al.*, 2007; RUSKAMP *et al.*, 2008; GARRED *et al.*, 2010). De acordo com Munthe-Fog *et al.* (2007), baixas concentrações de ficolina-2 estão abaixo de 3µg/ml, concentrações intermediárias compreendem o intervalo 3-6 µg/ml e as altas concentrações são maiores que 6 µg/ml, aproximadamente. Em caucasianos a mediana da concentração da ficolina-2 é de 5 µg/ml com uma variação interindividual de 1-12 µg/ml (HUMMELSHØJ *et al.*, 2005; MUNTHE-FOG *et al.*, 2007).

Sabe-se que a variação da produção interindividual de ficolina-2 é geneticamente influenciada e que baixos níveis sorológicos dessa proteína estão associados ao risco aumentado de infecção em humanos (HOLMSKOV *et al.*, 2003; HUMMELSHØJ *et al.*, 2005). Baixos níveis séricos de ficolina-2 estão envolvidos na gravidade da nefropatia por IgA e artrite reumatóide (ENDO *et al.*, 2007; HUMMELSHØJ *et al.*, 2005; MUNTHE-FOG *et al.*, 2007; GARRED *et al.*, 2009). Por outro lado, identificou-se uma associação entre proteção à hanseníase e haplótipos responsáveis por níveis normais desta proteína no plasma (MESSIAS-REASON *et al.*, 2009).

## 2.2 GENÉTICA DE POPULAÇÕES HUMANAS

### 2.2.1 Variação genética

#### 2.2.1.1 Equilíbrio de Hardy e Weinberg

De acordo com o princípio de Hardy e Weinberg, para um determinado par de alelos com frequências  $p$  e  $q$ , em uma população mendeliana em equilíbrio, a frequência dos diferentes genótipos em cada geração corresponderá a expressão  $p^2 + 2pq + q^2 = 1$ . Para populações grandes, é possível assumir que os cruzamentos são aleatórios e os fatores evolutivos são inexistentes ou causam efeitos desprezíveis nas frequências alélicas em gerações discretas. Este é um modelo referencial utilizado em situações realísticas, nas quais tanto os fatores do processo da reprodução quanto os fatores evolutivos são capazes de modificar as frequências alélicas. A frequência alélica constante indica que, na ausência de forças evolutivas específicas, o mecanismo de herança mendeliana é responsável pela manutenção das frequências alélicas ao longo das gerações (HARTL; CLARK, 2010).

#### 2.2.1.2 Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs)

As variações nas sequências de DNA em um determinado *locus* são chamados de alelos. A coexistência de múltiplos alelos em um *locus* é conhecida como polimorfismo genético. Um *locus* é definido como polimórfico quando o alelo

mais comum não ultrapassar a frequência de 95% na população (HARTL; CLARK, 2010). A menor unidade do polimorfismo genético é o polimorfismo de nucleotídeo único (ou SNP), no qual a variação ocorre apenas em um nucleotídeo em particular.

Do ponto de vista evolutivo, os padrões dos polimorfismos podem ser utilizados para fazer inferências sobre a história evolutiva e para investigação das relações genéticas entre subpopulações de uma espécie. Além disso, podem ser úteis como marcadores genéticos que podem estar ligados a genes deletérios causadores de doenças. Estes marcadores são amplamente aplicados na técnica de DNA *fingerprinting*, na qual os genótipos de dois ou mais indivíduos são comparados entre si por testes de verossimilhança (HARTL; CLARK, 2010).

### 2.2.1.3 Diversidade nucleotídica ( $\Pi$ )

A diversidade nucleotídica (Equação 1), proposta por Tajima (1983), é definida como a proporção média de diferenças nucleotídicas entre todos os possíveis pares de sequências. Essencialmente, é a medida da heterozigosidade no nível nucleotídico. Tal estatística pode ser utilizada no monitoramento da diversidade ecológica entre populações, na avaliação da variação genética intra e interpopulacional ou na determinação de relações evolutivas.

$$\Pi = \frac{\text{número total de diferenças de nucleotídeos}}{\text{número total de comparações par a par}} \quad (1)$$

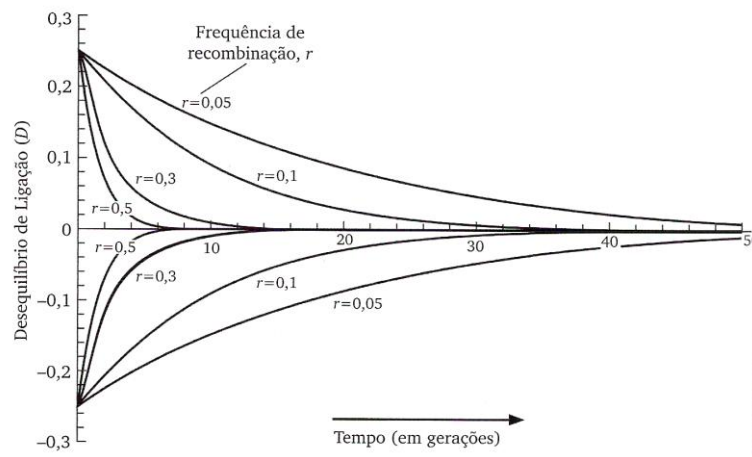
### 2.2.1.3 Ligação e desequilíbrio de ligação

Quando os alelos dos *loci* estão em associação aleatória, a frequência de qualquer combinação específica de alelos em um gameta é igual ao produto das frequências desses alelos. No equilíbrio de ligação ou de fase gamética, os alelos de qualquer *loci* são combinados aleatoriamente em genótipos de acordo com frequências esperadas na equação de Hardy e Weinberg.

A taxa de aproximação ao equilíbrio de ligação depende da frequência de recombinação ( $r$ ) nos genótipos heterozigotos para ambos os *loci*. Para *loci* muito distantes no mesmo cromossomo ou situados em cromossomos diferentes,  $r$  é igual a 0,5, uma vez que os quatro tipos gaméticos são produzidos na mesma frequência.

Para *loci* presentes no mesmo cromossomo, a frequência de recombinação necessariamente será menor que 0,5, definindo-os como *loci* ligados. Quando  $r=0$ , os *loci* estão tão próximos que a recombinação nunca ocorre entre eles.

O desequilíbrio de ligação, por sua vez, é uma associação não aleatória de alelos em dois ou mais *loci*. Este fenômeno é frequentemente observado entre SNPs intimamente ligados. O desequilíbrio de ligação entre *loci* desaparece gradualmente quando o cruzamento é aleatório, considerando que não existe força contrária favorecendo o desequilíbrio (figura 4).



**FIGURA 4 – DESAPARECIMENTO GRADUAL DO DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO**  
 FONTE: HARTL; CLARK, 2010.

O parâmetro de desequilíbrio de ligação pode ser mensurado através do cálculo do valor de  $D$  (Equação 2), quando as frequências gaméticas  $P_{AB}$ ,  $P_{ab}$ ,  $P_{Ab}$  e  $P_{aB}$  estão entre 0 e 1. Para  $D \neq 0$ , os *loci* estão em desequilíbrio de ligação, enquanto o equilíbrio de ligação entre eles é identificado por  $D = 0$ .

$$D = P_{AB}P_{ab} - P_{Ab}P_{aB} \quad (2)$$

FONTE: HARTL; CLARK, 2010.

O nível de dependência entre os *loci* é estimada através da quantidade  $D'$  pela Equação 3, quando  $D \geq 0$  ou pela Equação 4, se  $D < 0$ .

$$D' = \frac{D}{D_{\text{máx}}} \quad (3)$$

sendo que  $D_{\text{máx}}$  = o menor de  $p_Aq_b$  e  $q_a p_B$

FONTE: HARTL; CLARK, 2010.

$$D' = \frac{D}{D_{\min}} \quad (4)$$

sendo que  $D_{\min}$  = o maior de  $-p_A q_B$  e  $-q_a p_b$

FONTE: HARTL; CLARK, 2010.

## 2.2.2 Evolução molecular

### 2.2.2.1 Neutralidade seletiva

A teoria neutra ou neutralidade seletiva é a hipótese de que a maioria dos polimorfismos genéticos cujas frequências dependem do equilíbrio entre os efeitos da mutação e deriva genética aleatória (KIMURA, 1968; KING, JUKES, 1969). As mutações inserem novos alelos em uma população, e a deriva genética estabelece se o alelo neutro introduzido será perdido ou fixado, sendo que a perda é a ocorrência mais frequente. Para um alelo seletivamente neutro a probabilidade de fixação é igual à sua frequência inicial (KIMURA; OHTA, 1969). Essencialmente, o princípio de neutralidade afirma que grande parte das mutações exercem pouca influência sobre a sobrevivência e a reprodução dos organismos. Consequentemente, se a hipótese de neutralidade é verdadeira, assume-se que a seleção natural não é o fator determinante para causar mudanças nas frequências dos alelos neutros. Portanto, embora os alelos neutros não contribuam para os estudos de adaptação genética, a ausência de influência da seleção natural torna-os ideais para mapeamento da estrutura geográfica das populações e possibilita fazer inferências sobre as relações genealógicas dentro de e entre espécies (HARTL; CLARK, 2010).

Predições com base no modelo de sítios infinitos permitem testes estatísticos da hipótese de neutralidade baseados em várias características observadas em amostras verdadeiras, tais como a regularidade da distribuição do espectro de frequências alélicas (teste  $D$  de Tajima) ou o número de polimorfismos do tipo *singleton* versus não *singleton* (testes de Fu e Li) (HARTL; CLARK, 2010). *Singletons* são sítios segregantes no qual o nucleotídeo menos frequente está presente apenas uma vez na amostra. É comum que estes sítios apresentem alelos

com caráter deletério, os quais são mantidos em frequências baixas devido ao balanço entre seleção e mutação recorrente.

De acordo com Hartl e Clark (2010), a estatística de Tajima é capaz de distinguir a evolução molecular aleatória (ou neutra) e não aleatória das sequências de DNA. Os processos de evolução não aleatória incluem a seleção balanceadora, a expansão ou contração demográfica, a introgressão genética e o efeito carona. O raciocínio do cálculo de Tajima é baseado na diferença entre o número de sítios segregantes (Equação 5) e número médio de mutações par a par (Equação 6). Quando não há a ação de fatores evolutivos, os dois valores levam à estimativas consistentes de *theta* ( $\theta$ ). Se a discrepância entre estes valores é insignificante, então a diferença entre eles será igual a 0 e a hipótese de neutralidade seletiva não será rejeitada. Caso contrário, a hipótese da teoria neutra será rejeitada. O teste D de Tajima é uma versão normalizada da diferença  $\pi - S/a$ , no qual sua significância está baseada nas suas médias e significância de distribuição.

$$\hat{\theta} = S/a \quad (5)$$

Onde  $a$  corresponde ao número de sítios segregantes e  $S$  o tamanho amostral

$$\hat{\theta} = \pi \quad (6)$$

Onde  $\pi$  corresponde a diversidade nucleotídica (Equação 1)

Outra possibilidade de cálculo para a neutralidade seletiva é a estatística  $H$  (FAY; WU, 2000), a qual é baseada no efeito carona de genes ligados. O efeito carona pode ser descrito pela mudança de frequência em um *locus* polimórfico neutro devido a propagação de uma mutação vantajosa. O alelo neutro que estiver originalmente ligado a mutação, terá um aumento na frequência. Na ausência de recombinações, a variante alélica fixada será aquela que esteve originalmente ligada a mutação vantajosa. As possibilidades de recombinação são raras, mas quando ocorrem, todas as variantes que permanecem como segregantes estão presentes tanto em muito baixas como em altas frequências.

Os testes de Fu e Li (1993) também são amplamente utilizados para a verificação da hipótese da neutralidade seletiva. A propriedade se baseia no tamanho total esperado dos ramos externos e internos de árvores de coalescência<sup>1</sup> e na estimativa dos polimorfismos *singleton* e não *singleton* presentes na amostra.

Contudo, os testes atuais de verificação da significância da teoria neutra se baseiam na comparação entre os valores observados nos testes de neutralidade seletiva citados acima e os valores obtidos a partir de simulações de coalescência.

#### 2.2.2.2 Filogenética molecular

As técnicas de biologia molecular permitiram o aprimoramento da filogenética através da análise de sequência de aminoácidos ou nucleotídeos. Além de contribuírem para o entendimento das relações evolutivas entre os organismos, as comparações moleculares oferecem subsídios para testar hipóteses sobre os mecanismos evolutivos envolvidos. Para a reconstrução das árvores são utilizados algoritmos, tais como os métodos de UPGMA (*Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean*), quadrados mínimos, agrupamento de vizinhos, parcimônia e bayesianos (HARTL; CLARK, 2010).

No método de máxima parcimônia a árvore filogenética é construída com o menor número de eventos mutacionais necessários para explicar a evolução de um conjunto de sequências a partir de um ancestral comum. Como as árvores são estimativas complexas de relações filogenéticas, os ramos podem ter baixa ou alta confiança. Para medir a confiabilidade dos nós, utiliza-se o teste de *bootstrap* (FELSENSTEIN, 1985). Este teste realiza uma reamostragem dos dados, desenho da árvore e contagem dos nós presentes na árvore original. O valor indicado em cada nó indica a porcentagem das vezes no qual aquele agrupamento esteve presente nas árvores de reamostragem (HARTL; CLARK, 2010).

### 3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1 CASUÍSTICA

No presente trabalho foram analisadas e genotipadas uma amostra de 139 euro-brasileiros pertencentes ao Painel do Laboratório de Imunopatologia Molecular (Hospital de Clínicas/UFPR) e ao Hemepar. As coletas de sangue e extração de DNA dos 65 indivíduos do Painel do Laboratório foram previamente realizadas, com o devido esclarecimento e consentimento dos participantes.

Para a coleta de sangue dos 74 euro-brasileiros foi utilizado o termo de consentimento do projeto intitulado “Investigação do polimorfismo gênico de marcadores da resposta imune inata na infecção pelo HIV (vírus da imunodeficiência humana)”, previamente aprovado pelo Comitê em Ética de Pesquisa HC/UFPR. Para as análises de evolução molecular foram utilizados os dados de sequenciamento preexistentes, obtidos de outra amostragem de 137 doadores euro-brasileiros do Banco de Sangue-HC/UFPR. Para os três casos foram utilizados os seguintes critérios de inclusão: adultos, euro-brasileiros e saudáveis.

#### 3.2 COLETA

Após o devido esclarecimento e consentimento de 74 euro-brasileiros saudáveis, aproximadamente 10 ml de sangue venoso foram coletados e divididos em dois frascos: com etilenodiamino tetra-acético (EDTA) e sem anticoagulante. As amostras coletadas com EDTA foram centrifugadas e fracionadas em uma alíquota de plasma e uma da camada leuco-plaquetária (*buffy coat*), contendo cerca de 1 ml cada. A alíquota de 1ml do soro foi obtida do frasco sem anticoagulante, a partir do qual foram selecionadas as amostras de acordo com o resultado obtido dos testes sorológicos realizados no Centro de Hematoterapia e Hematologia do Paraná (HEMEPAR). As alíquotas foram armazenadas à temperatura de -80°C até o momento das análises laboratoriais.



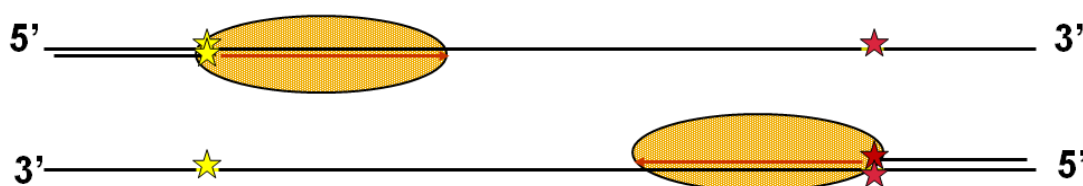
### 3.3 EXTRAÇÃO DE DNA

O DNA genômico foi extraído a partir do sangue total utilizando-se o kit comercial DNAzol (Invitrogen Life Technologies). O procedimento foi realizado conforme instruções do fabricante.

### 3.4 PCR-SSP

Na PCR sequência-específica (PCR-SSP), os iniciadores (ou primers) de 18 a 22 nucleotídeos são projetados de maneira que o último nucleotídeo a 5' seja complementar à variante polimórfica de interesse. A tipagem SSP baseia-se na premissa de que, se não houver complementaridade perfeita entre o último nucleotídeo (a 5') do iniciador e a fita-molde, não há amplificação da sequência desejada, o que permite a tipagem dos polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) dos genes candidatos na população estudada. Além disso, os iniciadores da PCR-SSP também devem ser compatíveis com um par de iniciadores genéricos que amplificam o controle endógeno da reação.

Neste trabalho, foram realizadas PCR-SSPs simples, uma vez que é amplificado apenas um fragmento específico por reação, e biespecíficas (Figura 5), onde são utilizados dois iniciadores específicos simultaneamente, permitindo a tipagem dos SNPs da região estudada em duas reações por amostra.



**FIGURA 5 – ACOPLAMENTO DOS INICIADORES EM UMA PCR BIESPECÍFICA**  
 FONTE: BOLDT (2009)

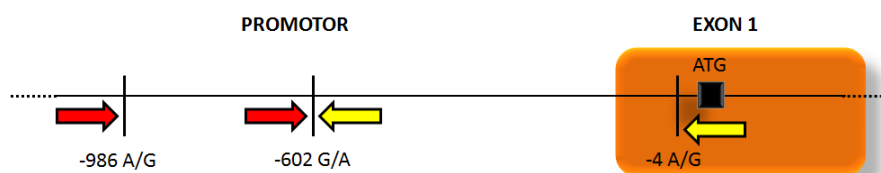
LEGENDA: Os SNPs estão representados pelas estrelas amarela e vermelha. As linhas longas representam a fita codificante (5'>3') e a fita molde (3'>5'), onde se acoplam o iniciador direto e reverso, respectivamente. As linhas curtas com estrela na extremidade ilustram a complementaridade perfeita do último nucleotídeo (a 5') dos iniciadores com as fitas de DNA. A Taq DNA polimerase está representada com o círculo com uma seta interna vermelha indicando atividade da mesma.

Para cada reação de PCR utilizou-se de 50 a 500 ng de DNA genômico e 0,1 a 0,3  $\mu\text{M}$  de cada iniciador específico na presença de 1,5 a 2,0 mM de  $\text{MgCl}_2$ , 0,2 mM de cada deoxinucleotídeo trifosfatado, KCl 50 mM, Tris-HCl 10 mM e 0,5 a 2 unidades de Taq polimerase. A amostra de 139 euro-brasileiros foi submetida à reação de PCR em termociclador sob as seguintes condições de ciclagem: 94°C (período de desnaturação) por 20 segundos e terminando com 72°C (período de extensão) por 30 segundos. A temperatura de acoplamento dos iniciadores foi de 66°C nos 10 primeiros ciclos, 63°C nos 10 seguintes e 61°C nos 10 últimos ciclos, garantindo boa especificidade e quantidade de produto. Cada PCR é acompanhada de controles negativos que são soluções de reação completas, sem o DNA, e amostras de DNA de genótipos conhecidos, utilizados como controle endógeno.

### 3.4.1 PCR-SSP *FCN2*

Foram analisados três polimorfismos situados a -986, -602 e -4 pb do sítio de início da transcrição (ATG) do promotor do gene *FCN2*. Os iniciadores diretos e reversos (Tabela 1) foram desenhados de acordo com a sequência *NT\_019501* do cromossomo 9 (ANEXO 1). As regiões de acoplamento dos iniciadores e as respectivas localizações dos polimorfismos estudados estão ilustrados na figura 6.

O resultado da amplificação foi observado após corrida eletroforética em gel de agarose a 1,5 % corado com brometo de etídio ou Sybrsafe (Invitrogen, EUA), fluorescentes sob radiação ultravioleta ou luz azul, respectivamente. Em todos os casos, a genotipagem foi rápida e baseada na análise do padrão eletroforético dos fragmentos amplificados.



**FIGURA 6** - REGIÕES DE ACOPLAMENTO DOS INICIADORES NA PCR-SSP DO GENE *FCN2*  
FONTE: O autor (2009)

LEGENDA: Seta vermelha: iniciador direto; Seta amarela: iniciador reverso; ATG: sítio de início da transcrição; em laranja: Exon 1. Os SNPs foram numerados a partir do sítio de início da transcrição.

**TABELA 1 – SEQUÊNCIA DOS INICIADORES E TAMANHO DOS FRAGMENTOS PRODUZIDOS**

Iniciador direto		Iniciador reverso		Fragmento
PCR-SSP -986 a -4 (Prom13)				
FCN2 Prom -986 Af	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCA 3'	FCN2 Prom -4 Ar	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCT 3'	1022 pb
FCN2 Prom -986 Gf	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCG 3'	FCN2 Prom -4 Gr	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCC 3'	1022 pb
PCR-SSP -986 a -602 (Prom12)				
FCN2 Prom -986 Af	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCA 3'	FCN2 Prom -602 Ar	5' TATGTAGAGCACAGGGGCACAT 3'	374 pb
FCN2 Prom -986 Gf	5' ACCTCGGCATCCCGATGGCG 3'	FCN2 Prom -602 Gr	5' TATGTAGAGCACAGGGGCACAC 3'	374 pb
PCR-SSP -602 a -4 (Prom23)				
FCN2 Prom -602 Af	5' TCTCTCCTTTCCCTCCTGTTCA 3'	FCN2 Prom -4 Ar	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCT 3'	648 pb
FCN2 Prom -602 Gf	5' TCTCTCCTTTCCCTCCTGTTCG 3'	FCN2 Prom -4 Gr	5' GCTCTGTCCAGCTCCATCTCC 3'	648 pb
Controle endógeno				
HGH f *	5' TGCCTTCCCAACCATTCCCTTA 3'	HGH r *	5' CCACTCACGGATTTCTGTTGTGTTTC 3'	431 pb

LEGENDA: HGH – *Human Growth Hormone*; f – *forward* (ou direto); r – *reverse* (ou reverso); Em negrito – nucleotídeos variantes; pb – pares de base; Prom - promotor

### 3.5 ENSAIOS DE IMUNOADSORBÂNCIA ENZIMÁTICA (ELISA)

A concentração plasmática de ficolina-2 foi avaliada em 40 amostras, previamente sequenciadas na Alemanha, compostas por indivíduos de diferentes genótipos. A metodologia utilizada foi o ensaio de imunoadsorbância enzimática (ELISA) com o kit HK336 (Hycult Biotechnology, Países Baixos) para a detecção de 16-1.000 ng/ml de ficolina-2, seguindo-se as instruções do fabricante (ANEXO 2).

### 3.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA E FILOGENÉTICA

Para as 139 amostras tipadas através da PCR-SSP neste trabalho, foram determinadas as frequências alélicas e genótípicas através de contagem direta. As hipóteses de equilíbrio de Hardy e Weinberg, segundo Guo e Thompson (2002), e de equilíbrio de ligação, segundo Slatkin e Excoffier (1996), foram avaliadas utilizando-se o pacote de programas ARLEQUIN v.3.5 (EXCOFFIER, 2010). O teste de desequilíbrio de ligação entre todos os pares de *loci*, foi configurado com 10.000 passos da cadeia de Markov e 1.000 passos de desmemorização. Como parâmetros de desequilíbrio de ligação, calculou-se os valores de  $D$ ,  $D'$  e  $r^2$ . Além disso, foi gerado uma representação gráfica do desequilíbrio de ligação entre os loci -986, -602 e -4 através do programa Haploview v.4.2 (BARRETT *et al.*, 2005). O teste de homogeneidade entre as amostras genotipadas neste trabalho e os dados encontrados na literatura foi realizado através do teste de Fisher 2 por 5 do SISA (UITENBROEK, 1997).

Para as 137 amostras previamente sequenciadas para o gene *FCN2*, foi realizada a reconstrução dos haplótipos através do algoritmo ELB gerado pelo ARLEQUIN v.3.5. A diversidade nucleotídica ( $P_i$ ) foi calculada com o programa DNAsp v.5. O mesmo programa foi utilizado para testar a hipótese de neutralidade seletiva com os testes  $F$  de Fu e Li (FU; LI, 1993) e  $D$  (TAJIMA, 1983). Além disso, foi realizada uma busca por sequências similares com a região sequenciada para *FCN2* através da ferramenta BLAST (NCBI, 2010a) para definir um grupo externo que permitisse a realização de estatísticas adicionais da neutralidade seletiva. Com isso, o cálculo do teste  $F$  foi repetido e a estatística de  $H$  (FAY; WU, 2000) foi realizada após o alinhamento da sequência do promotor de *FCN2* com o grupo externo.

A construção da árvore filogenética foi realizada pelo método de Máxima Parcimônia com 1.000 replicações de reamostragem *bootstrap* do programa MEGA v.4 (TAMURA *et al.*, 2007). Para este teste, foram utilizados os SNPs *g.680489G>A* (-986 G>A), *g.680561C>T* (-915C>T), *g.680573C>A* (-902C>A), *g.680873G>A* (-602G>A), *g.680918A>G* (-557A>G), *g.680922G>A* (-553G>A), *g.681181G>A* (-294G>A), *g.681406G>A* (-69G>A), *g.681411A>C* (-64A>C) e *g.681471A>G* (-4A>G) da região promotora; e os SNPs *g.681486C>A* (+12C>A) não sinônimo e *g.681507C>T* (+33C>T) sinônimo do exon 1, identificados nas amostras sequenciadas e as sequências alinhadas pelo BLAST (NCBIb, 2010) do promotor de *FCN2* de *Pan troglodytes* e *Macaca mulatta* como referência.

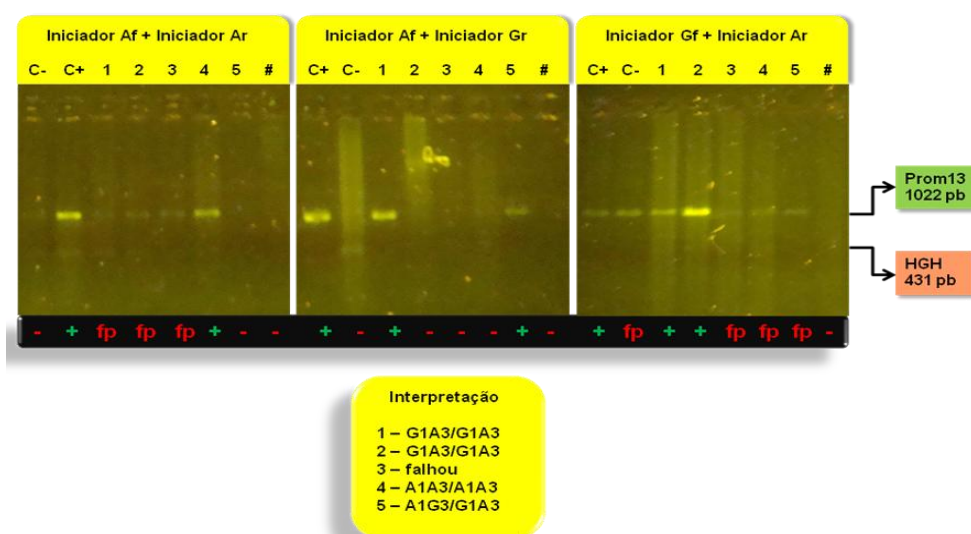
A partir da dosagem plasmática de ficolina-2 das 40 amostras, foi estabelecida a curva padrão através do método de regressão logística não linear dos cinco parâmetros (5PL) gerada pelo programa MasterPlex ReaderFit 2010 (Hitachi Software Engineering America Ltda, EUA). A possibilidade de associação entre genótipo e fenótipo foi testada através dos testes não paramétricos de Kruskal-Wallis e *Wilcoxon Signed Rank Test* (WSRT) do programa GraphPad Prism 5 (GraphPad Software, EUA).

## 4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 4.1 PADRONIZAÇÃO DA PCR-SSP *FCN2*

#### 4.1.1 Tipagem -986/-4

Inicialmente, amplificou-se o fragmento -986 a -4 (*Prom13*), totalizando 1022 pares de base (pb). Durante a amplificação deste fragmento encontraram-se dificuldades na eliminação de resultados falso-positivos. Para solucionar este problema, utilizaram-se reagentes que aumentam a especificidade da reação, como a Taq polimerase Platinum (Invitrogen, São Paulo) e Solução Q (Qiagen, Hilden, DE). Além disso, mudaram-se as temperaturas de acoplamento dos iniciadores, entre outras estratégias. Os padrões eletroforéticos desta amplificação estão ilustrados na figura 7.



**FIGURA 7 - GEL DE ELETROFORESE DA AMPLIFICAÇÃO DO PROM13**

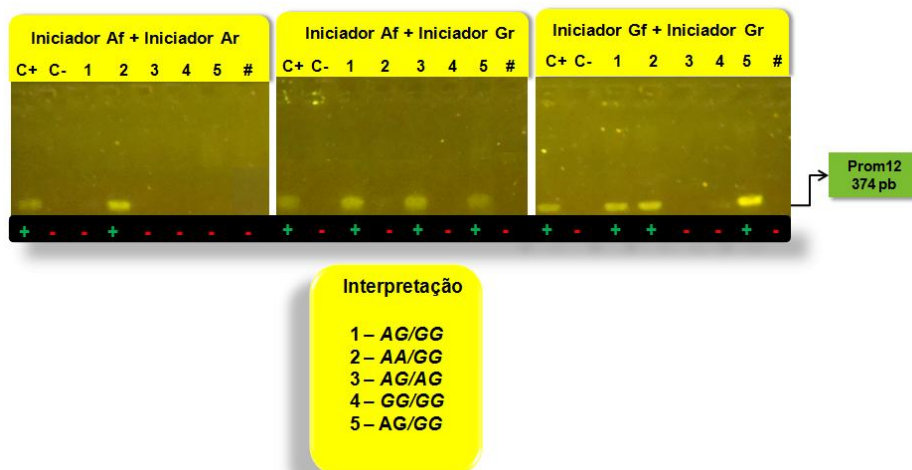
FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: C-: controle negativo com DNA; C+: controle positivo; #: controle negativo sem DNA +: positividade para a amplificação; -: negatividade para a amplificação; HGH: *Human Growth Hormone*. A interpretação é a genotipagem referente à amplificação do fragmento Prom13.

#### 4.1.2 Tipagens -986/-602 e -602/-4

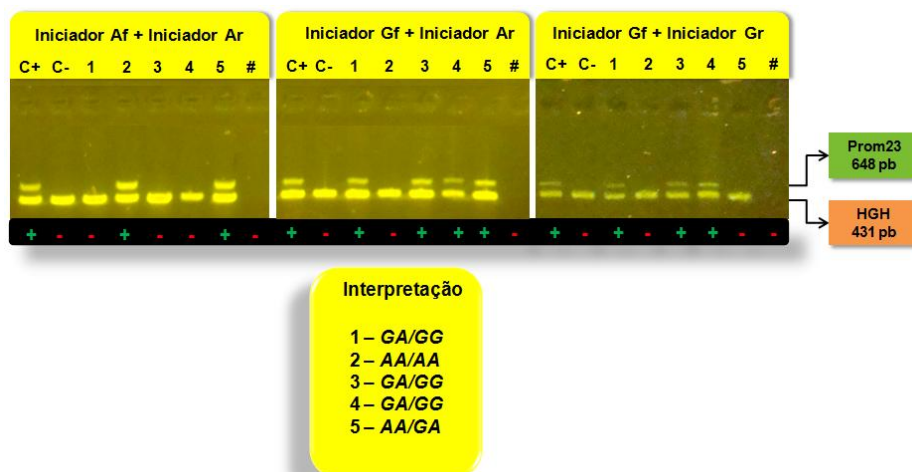
A otimização prosseguiu com a amplificação de dois fragmentos, -986 a -602 (*Prom12*), com 374 pb, e -602 a -4 (*Prom23*), com 648 pb, em reações separadas, porém simultâneas, a fim de se obter o genótipo completo para o promotor de *FCN2*.

Foi realizada uma PCR-SSP com gradiente de temperatura e testes de concentrações dos reagentes para definir as condições ideais destas amplificações, resultando em quatro cálculos finais (ANEXO 3). O padrão eletroforético das amplificações de *Prom12* e 23 estão ilustradas, respectivamente, nas figuras 8 e 9.



**FIGURA 8 - GEL DE ELETROFORESE DA AMPLIFICAÇÃO DO PROM12**  
 FONTE: O autor (2010)

Legenda: C-: controle negativo com DNA; C+: controle positivo; #: controle negativo sem DNA +: positividade para a amplificação; -: negatividade para a amplificação. A interpretação é a genotipagem referente à amplificação do fragmento Prom12.



**FIGURA 9 - GEL DE ELETROFORESE DA AMPLIFICAÇÃO DO PROM23**  
 FONTE: O autor (2010)

Legenda: C-: controle negativo com DNA; C+: controle positivo; #: controle negativo sem DNA +: positividade para a amplificação; -: negatividade para a amplificação; HGH: *Human Growth Hormone*. A interpretação é a genotipagem referente à amplificação do fragmento Prom23.

A amplificação dos fragmentos *Prom12* e *Prom23* foi mais confiável do que a do fragmento *Prom13*, uma vez que os resultados deste último estavam em desequilíbrio de Hardy e Weinberg e o aparecimento de indivíduos falso positivos era frequente. Além disso, houve 100% de concordância entre as genotipagens *Prom12* e *Prom23* e os resultados obtidos por sequenciamento em 12 controles-cegos, previamente sequenciados.

## 4.2 ANÁLISE ESTATÍSTICA E FILOGENÉTICA

O conteúdo dos itens 4.2.1 ao 4.2.3 correspondem as análises obtidas das 139 amostras genotipadas pela PCR-SSP para *FCN2*. Do item 4.2.4 ao 4.2.6 as análises foram realizadas com os dados de sequenciamento da região promotora de *FCN2* obtidos de 137 amostras. O item 4.2.7 compreende a correlação genótipo *versus* fenótipo de ficolina-2 em uma amostragem de 40 indivíduos previamente sequenciados para o promotor do gene *FCN2*.

### 4.2.1 Frequência genotípica, haplotípica e alélica

As frequências genotípicas e haplotípicas para os polimorfismos -986G>A, -602G>A e -4A>G encontram-se listadas nas tabelas 2 e 3, respectivamente.

**TABELA 2 - FREQUÊNCIA GENOTÍPICA DO PROMOTOR DE *FCN2* (EURO-BRASILEIROS)**

<b>Genótipo</b>	<b>N (%)</b>
<b>-986-602-4/-986-602-4</b>	
AGG/GGA	33 (23,74)
GGA/GGA	32 (23,02)
AAA/GGA	28 (20,14)
AAA/AGG	14 (10,07)
AGA/GGA	10 (7,20)
AAA/AAA	8 (5,75)
AGG/AGG	8 (5,75)
AGA/AGG	4 (2,90)
AAA/AGA	1 (0,72)



<b>Genótipo</b>	<b>N (%)</b>
<b>-986-602-4/-986-602-4</b>	
AGA/AGA	1 (0,72)
<b>Total</b>	<b>139 (100)</b>

LEGENDA: N – número de indivíduos  
FONTE: O autor (2010)

**TABELA 3 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA DO PROMOTOR DE *FCN2* (EURO-BRASILEIROS)**

<b>Haplótipo</b>	<b>n (%)</b>
<b>-986-602-4</b>	
GGA	135 (48,6)
AGG	67 (24,1)
AAA	59 (21,2)
AGA	17 (6,1)
<b>Total</b>	<b>278 (100)</b>

LEGENDA: n – número de cromossomos  
FONTE: O autor (2010)

As frequências haplotípicas obtidas foram comparadas com os dados do estudo realizado por de MESSIAS-REASON *et al.* (2009a), no qual 210 euro-brasileiros saudáveis foram sequenciados para o promotor de *FCN2*, obtendo-se as seguintes frequências, para as regiões -986, -602 e -4: AAA (19,1%), AAG (0,5%), AGG (20,3%), AGA (7,4%), GAA (1,2%), GGA (50,2%), GGG (1,2%). A semelhança proporcional entre as frequências haplotípicas foi confirmada com uma probabilidade igual a 0,91. Os três haplótipos mais comuns foram GGA, AGG e AAA, com uma frequência cumulativa de 93,9% neste trabalho e 89,6% no de MESSIAS-REASON *et al.*, 2009a.

De acordo com os dados da tabela 4, o alelo -986\*G é muito mais frequente em africanos e asiáticos, assim como o alelo -602\*G. O alelo -4\*A é mais comum em asiáticos. Nos euro-americanos, a distribuição dos alelos na posição -986 é similar, porém os alelos -986\*A, -602\*G e -4\*A prevalecem nesta população. As frequências alélicas dos euro-brasileiros genotipados neste trabalho (tabela 5) e de euro-americanos (tabela 4) são semelhantes entre si ( $p=0,72$  para a posição -986;  $p=0,44$  para a posição -602; e  $p=0,41$  para o posição -4). A distribuição alélica entre as

demais populações foi diferente ( $p \leq 0,0015$ ), com exceção da posição -4 entre os euro-brasileiros e africanos ( $p=0,76$ ), europeus e africanos ( $p=0,61$ ). Com isso, observou-se que as frequências alélicas deste trabalho estão distribuídas de acordo com o esperado em populações de ascendência europeia.

**TABELA 4 - DISTRIBUIÇÃO GEOGRÁFICA DAS FREQUÊNCIAS ALÉLICAS (%) DOS SNPS DO PROMOTOR DO GENE *FCN2***

SNPs	dbSNP Grp. Subm.	N Pop	Europeus	N Pop	Africanos	N Pop	Asiáticos
<i>g.680489G&gt;A</i> (-986 G>A)	rs3124952 CSHL-HapMap	226 EA	A – 54,0 G – 46,0	280 NG	A – 19,6 G – 80,4	172 JP 86 CH	A – 11,6 G – 88,4 A – 7,0 G – 93,0
<i>g.680873G&gt;A</i> (-602 G>A)	rs3124953 CSHL-HapMap	120 EA	A – 25,8 G – 74,2	120 NG	A – 0,8 G – 99,2	88 JP 90 CH	A – 5,7 G – 94,3 A – 2,2 G – 97,8
<i>g.680918A&gt;G</i> (-557 A>G)	rs3811140 PERLEGEN	48 EA	A – 18,8 G – 81,2	46 AA	A – 17,4 G – 82,6	48 CH	A – 16,7 G – 83,3
<i>g.681411A&gt;C</i> (-64 A>C)	rs7865453 1000GENOMES	72 EA	A – 98,6 C – 1,4	50 NG	A – 82,0 C – 18,0	88 CH+JP	A – 88,6 C – 11,4
<i>g.681471A&gt;G</i> (-4 A>G)	rs17514136 1000GENOMES	72 EA	A – 70,8 G – 29,2	50 NG	A – 74,0 G – 26,0	88 CH+JP	A – 92,0 G – 8,0

LEGENDA: SNPs – polimorfismos de nucleotídeo único; N – número de cromossomos; Pop – população; dbSNP (NCBI2010a); Grp. Subm. – Grupo responsável pela submissão dos respectivos dados; AA – Afro-americanos; CH – Chineses; EA – Euro-americanos; NG – Nigerianos; JP – Japoneses.

NOTA: A denominação entre parênteses dos SNPs está de acordo com as normas da Human Genome Variation Society (HGVS). Os valores das frequências alélicas estão em %.

**TABELA 5 - FREQUÊNCIA ALÉLICA DO PROMOTOR DE *FCN2* (EURO-BRASILEIROS)**

Alelos	%
-986*A	51,44
-986*G	48,56
-602*A	21,22
-602*G	78,78
-4*A	75,90
-4*G	24,10

FONTE: O autor (2010)

#### 4.2.2 Equilíbrio de Hardy e Weinberg

Para a tipagem -986/-4 (Prom13) foi verificado um desequilíbrio de Hardy e Weinberg para a posição -986 ( $p=0,005$ ). Na tipagem utilizando-se as amplificações -986/-602 e -602/-4, não houve desvio da hipótese de equilíbrio de Hardy e Weinberg para os para os três *loci* estudados através da PCR-SSP de *FCN2* (Tabela 6). Nesta população, podem-se assumir as premissas de que os cruzamentos são aleatórios; as gerações são discretas; o tamanho populacional é representativo; e os efeitos evolutivos de migração, mutação e seleção natural são desprezíveis.

**TABELA 6 - EQUILÍBRIO DE HARDY E WEINBERG PARA O GENÓTIPO COMPLETO DO PROMOTOR DE *FCN2* (EURO-BRASILEIROS)**

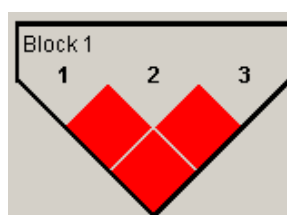
Locus	#Genot.	Het. Obs.	Het. Esp.	P	D. P.
-986	139	0,511	0,501	0,864	0,001
-602	139	0,309	0,336	0,445	0,002
-4	139	0,367	0,367	1,000	0,000

FONTE: Arlequin v. 3.5 (EXCOFFIER; LISCHER, 2010)

NOTA: #Genot.: número de genótipos; Het. Obs.: frequência de heterozigotos observada; Het. Esp.: frequência de heterozigotos esperada; P: probabilidade; D. P.: desvio padrão.

#### 4.2.3 Desequilíbrio de ligação

O desequilíbrio de ligação foi verificado entre todos os *loci* das amostras genotipadas pela PCR-SSP *FCN2* com valor máximo de  $D'$  (Figura 10). Este valor indica que os *loci* estudados estão em ligação absoluta. Os valores absolutos do coeficiente de desequilíbrio de ligação ( $D$ ) foram inseridos nas frequências haplotípicas observadas em cada combinação de *loci* (Gráficos 1, 2 e 3).

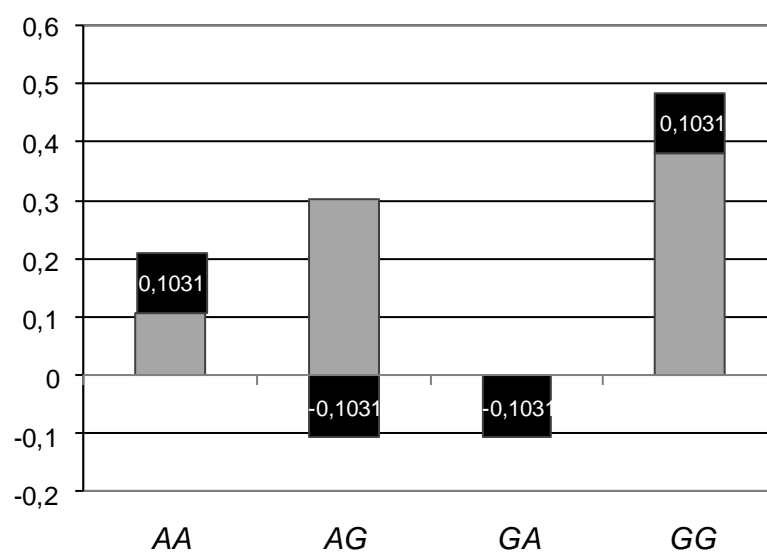


LEGENDA: Em vermelho –  $D' = 1,00$ ; 1: - 986; 2: - 602; 3: -4.

FONTE: Haploview v. 4.2. (BARRET *et al.*, 2005)

**FIGURA 10 – DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS LOCI -986, -602 e -4**

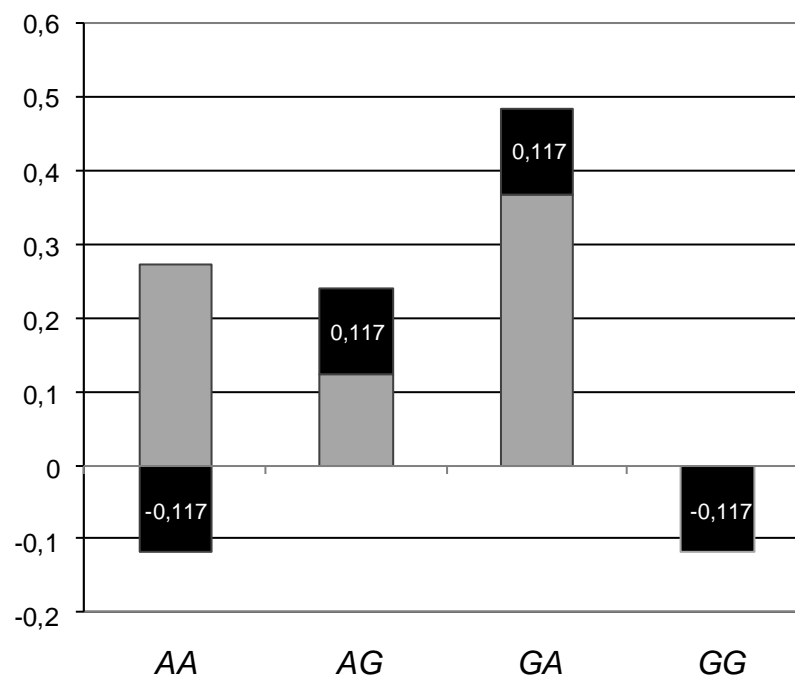
FONTE: O autor (2011)



**GRÁFICO 1 – FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS *LOC* - 986 E -602**

FONTE: O autor (2010)

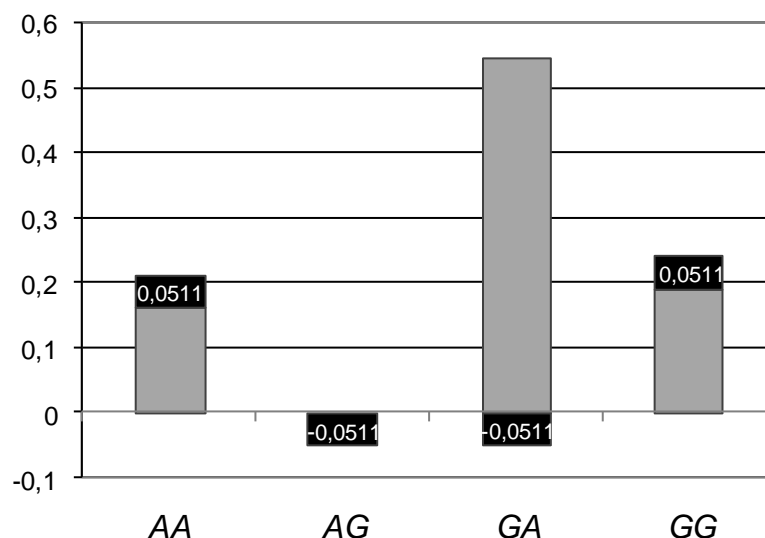
LEGENDA: Em preto - valores dos coeficientes de desequilíbrio de ligação (*D*).



**GRÁFICO 2 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS *LOC* - 986 E -4**

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: Em preto - valores dos coeficientes de desequilíbrio de ligação (*D*).



**GRÁFICO 3 - FREQUÊNCIA HAPLOTÍPICA E DESEQUILÍBRIO DE LIGAÇÃO ENTRE OS *LOCi* - 602 E -4**

FONTE: O autor (2010)

LEGENDA: Em preto - valores dos coeficientes de desequilíbrio de ligação (*D*).

De acordo com estes dados, não foram encontradas as combinações - 986\*G/-602\*A, -986\*G/-4\*G e -602\*A/-4\*G. A provável explicação para o desequilíbrio de ligação observado entre os *loci* -986, -602 e -4 é a alta proximidade física dos SNPs, que é inversamente proporcional à taxa de recombinação.

#### 4.2.4 Blast

A pesquisa por regiões similares às sequências do promotor de *FCN2* obtidas na Alemanha, resultou na seleção das seguintes regiões de interesse para a análises de neutralidade seletiva com grupo externo e para a construção da árvore filogenética:

- 1278 pb da região promotora de *FCN2* de *Pan troglodytes* (chimpanzé), localizada no cromossomo 9, apresentando 98% de similaridade;
- 1281 pb da região promotora de *FCN2* de *Macaca mulatta* (macaco-rhesus), localizada no cromossomo 15, apresentando 90% de similaridade;

#### 4.2.5 Neutralidade seletiva

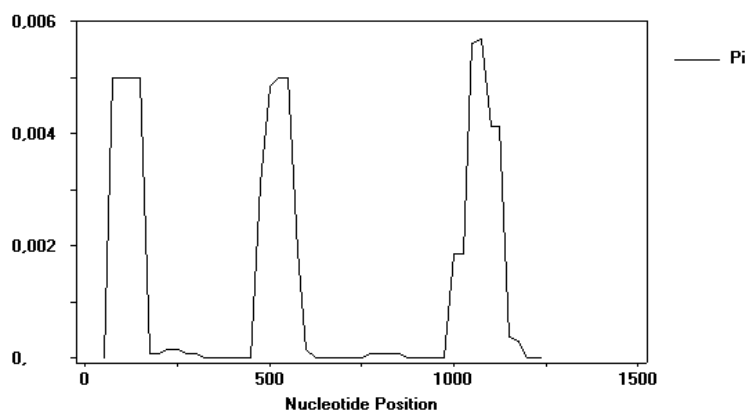
Os valores resultantes das estatísticas  $D$  de Tajima (1983) e  $F$  de Fu e Li (1993) estão discriminados na Tabela 7, juntamente com a diversidade nucleotídica. Adicionalmente, foram gerados gráficos (4, 5 e 6) contendo os valores da diversidade nucleotídica, de  $D$  de Tajima e de  $F$  de Fu e Li por janela deslizante de 100 pb. Os cálculos dos testes  $F$  de Fu e o teste  $H$  de Fay e Wu foram realizados após o alinhamento da sequência do promotor de *FCN2* de *Pan troglodytes* (chimpanzé) classificado como grupo externo (Tabela 7).

**TABELA 7 - NEUTRALIDADE SELETIVA E DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA SEM GRUPO EXTERNO**

Testes estatísticos N = 269	Valor	P
Diversidade nucleotídica (Pi)	0,00127	-
$D$ de Tajima	-0,39428	> 0,05
$F$ de Fu e Li	-1,29264	> 0,05

NOTA: Significância estatística ( $p < 0,05$ )

FONTE: O autor (2011)



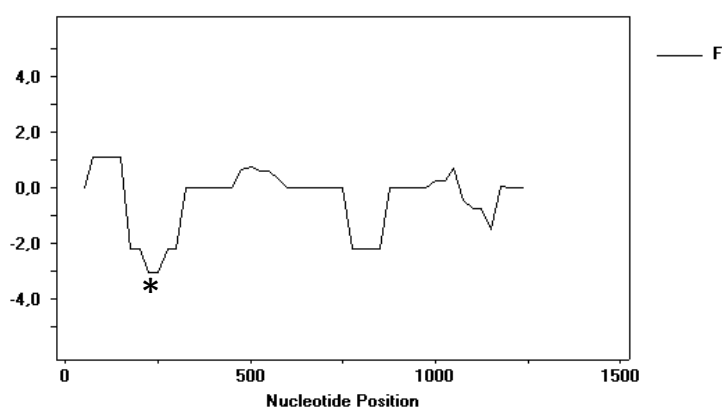
**GRÁFICO 4 – DIVERSIDADE NUCLEOTÍDICA DO PROMOTOR E DA PORÇÃO INICIAL DO EXON 1 DO GENE *FCN2* SEM GRUPO EXTERNO**

FONTE: DNAsp v.5. (LIBRADO; ROZAS, 2009)

LEGENDA: Eixo Y – diversidade nucleotídica; Eixo X – posição do nucleotídeo; Pi – diversidade nucleotídica

De acordo com o gráfico 4, a diversidade nucleotídica ( $Pi$ ) apresentou 3 picos ao longo das sequências estudadas. O primeiro pico compreendeu a região do nucleotídeo 26 ao 200, com um valor de  $Pi$  igual a 0,00501, sendo que os SNPs -

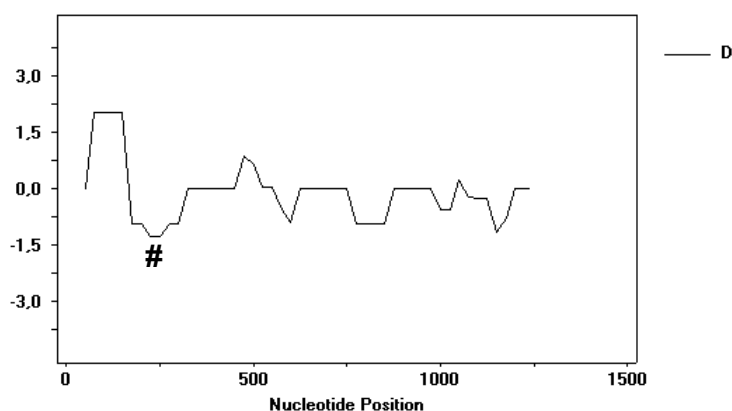
986G>A (nucleotídeo 119) e -915C>T (nucleotídeo 191) estão localizados nesta área. O segundo pico apresentou uma distribuição entre os nucleotídeos 426 e 625, com um  $P_i$  máximo de 0,00499 do nucleotídeo 476 ao 600. O valor máximo de  $P_i$  para esta região, compreende os SNPs -602G>A (nucleotídeo 503), -557A>G (nucleotídeo 548) e -553G>A (nucleotídeo 552). O terceiro pico abrangeu a região de maior diversidade nucleotídica, compreendida entre os nucleotídeos 1001 a 1175 com um valor de  $P_i$  variando de 0,00412 a 0,00568. Nesta área encontram-se os SNPs -69G>A (nucleotídeo 1035), -64A>C (nucleotídeo 1040), -4A>G (nucleotídeo 1100), +12C>A (nucleotídeo 1115) e +33C>T (nucleotídeo 1136).



**GRÁFICO 5 – TESTE  $F$  DE FU E LI PARA O PROMOTOR E PORÇÃO INICIAL DO EXON 1 DO GENE *FCN2* SEM GRUPO EXTERNO**

Fonte: DNAsp v.5. (LIBRADO; ROZAS, 2009)

Legenda: Eixo Y – valores de  $F$ ; Eixo X – posição do nucleotídeo;  $F$  –  $F$  de Fu e Li; \* –  $p < 0,05$ .



**GRÁFICO 6 – TESTE  $D$  DE TAJIMA PARA O PROMOTOR E PORÇÃO INICIAL DO EXON 1 DO GENE *FCN2***

Fonte: DNAsp v.5. (LIBRADO; ROZAS, 2009)

Legenda: Eixo Y – Valores de  $D$ ; Eixo X – posição do nucleotídeo;  $D$  –  $D$  de Tajima; # –  $p < 0,10$ .

Na ausência do grupo externo, não houve desvio da neutralidade seletiva de acordo com os dados estatísticos relatados na tabela 6. Porém, a análise por janela deslizante revelou uma região com desvio significativo de neutralidade seletiva no teste  $F$  de Fu e Li (Gráfico 5) e uma região com tendência à significância no teste  $D$  de Tajima (Gráfico 6). Para a estatística  $F$ , obtiveram-se valores negativos significativos ( $p < 0,05$ ) na região compreendida entre os nucleotídeos 176 e 300, onde estão localizados os SNPs -915 C>T e -902 C>A (nucleotídeo 203). Para a estatística  $D$  (TAJIMA, 1983) a região com tendência à significância está entre os nucleotídeos 26 e 200, onde estão localizados os SNPs -986G>A e -915C>T, com um valor de +2,02.

Quando as sequências humanas foram comparadas com o grupo externo (*Pan troglodytes*), observaram-se valores significativos (Tabela 8) para o desvio da neutralidade seletiva de acordo com os testes  $H$  (FAY; WU, 2000). As respectivas estatísticas da tabela 8 foram analisadas por janela deslizante e plotadas em gráficos (7 e 8). Embora o teste  $F$  de Fu e Li não tenha sido significativo (Tabela 8), observou-se uma região com valores negativos significativos ao longo das posições nucleotídicas (Gráfico 7). Esta região compreende os nucleotídeos 176 ao 300, que contêm os SNPs -915C>T e -902C>A. Para a estatística  $H$  de Fay e Wu, observou-se duas regiões significativas ( $p = 0,01$ ), com valores negativos, entre os nucleotídeos 728 e 902, onde está localizado o SNP -294G>A; e do nucleotídeo 1054 ao 1228, que contêm os SNPs -4A>G e +12C>A.

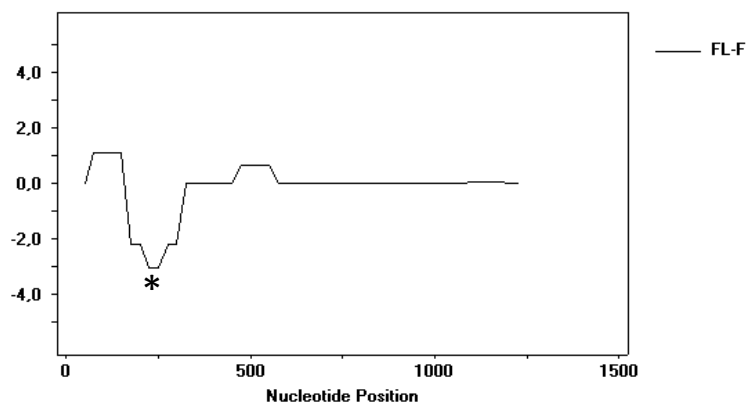
**TABELA 8 -** NEUTRALIDADE SELETIVA COM GRUPO EXTERNO (*Pan troglodytes*)

Testes estatísticos N = 270	Valor	P
F de Fu e Li	-0,95425	> 0,05
H de Fay e Wu	-3,6067	0,01

NOTA: Significância estatística ( $p < 0,05$ )

FONTE: O autor (2011)

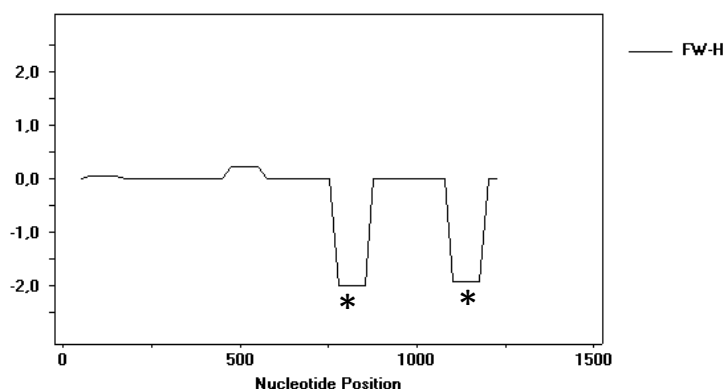




**GRÁFICO 7 – TESTE  $F$  DE FU E LI PARA O PROMOTOR E PORÇÃO INICIAL DO EXON 1 DO GENE *FCN2* COM GRUPO EXTERNO**

FONTE: DNAsp v.5. (LIBRADO; ROZAS, 2009)

LEGENDA: Eixo Y – Valores de  $F$ ; Eixo X – posição do nucleotídeo; FL-F –  $F$  de Fu e Li; \* -  $p < 0,05$ .



**GRÁFICO 8 – TESTE  $H$  DE FAY E WU PARA O PROMOTOR E PORÇÃO INICIAL DO EXON 1 DO GENE *FCN2* COM GRUPO EXTERNO**

FONTE: DNAsp v.5. (LIBRADO; ROZAS, 2009)

LEGENDA: Eixo Y – Valores de  $H$ ; Eixo X – posição do nucleotídeo; FW-H –  $H$  de Fay e Wu; \* -  $p = 0,01$ .

As regiões de maior diversidade nucleotídica foram observadas nas posições dos SNPs de interesse deste trabalho (-986, -602 e -4), sendo que o maior pico inclui, também, os sítios de polimorfismos não sinônimo (+12 C>A) e sinônimo (+33 C>T) do exon 1 (Gráfico 4). Apesar de não possuir desvio de neutralidade seletiva entre as sequências intraespecíficas, observou-se que a região nucleotídica contendo os SNP -915 C>T apresenta uma rejeição significativa da hipótese neutra baseada nos testes  $F$  de Fu e Li (Gráfico 5) e  $D$  de Tajima (Gráfico 6). Quando as sequências intraespecíficas foram comparadas com um grupo externo, observou-se um desvio da neutralidade seletiva baseado no teste  $H$  de Fay e Wu (Gráfico 8).

Duas regiões comuns apresentaram rejeições significativas da hipótese neutra, uma contendo o SNP -294 G>A e outra compreendendo os SNPs -4 A>G e +12 C>A. Os valores negativos para o teste *H* são frequentemente associados ao efeito carona ocasionado por seleção positiva e/ou expansão populacional (FAY, WU, 2000). A seleção positiva da mutação vantajosa dos SNPs -986 G>A, -602 G>A e -4 A>G, associados aos altos níveis séricos de ficolina-2, pode ter ocorrido através do efeito carona observado no teste *H* de Fay e Wu (2000). A hipótese de expansão populacional também pode ser sugerida visto que há indícios de que a população humana experimentou um efeito de gargalo há 70.000 anos, resultando na diminuição global da diversidade genética. Além disso, na população primitiva, diminuições abruptas de tamanho causadas por guerras, epidemias, fome e outras catástrofes, eram frequentes (BEIGUELMAN, 2008).

#### 4.2.6 Filogenética molecular

A alta similaridade das regiões alinhadas de *Pan troglodytes* e *Macaca mulatta* permitiu a construção de uma árvore filogenética que estabelecesse a história e as relações evolutivas dos SNPs da região promotora de *FCN2* na população humana.

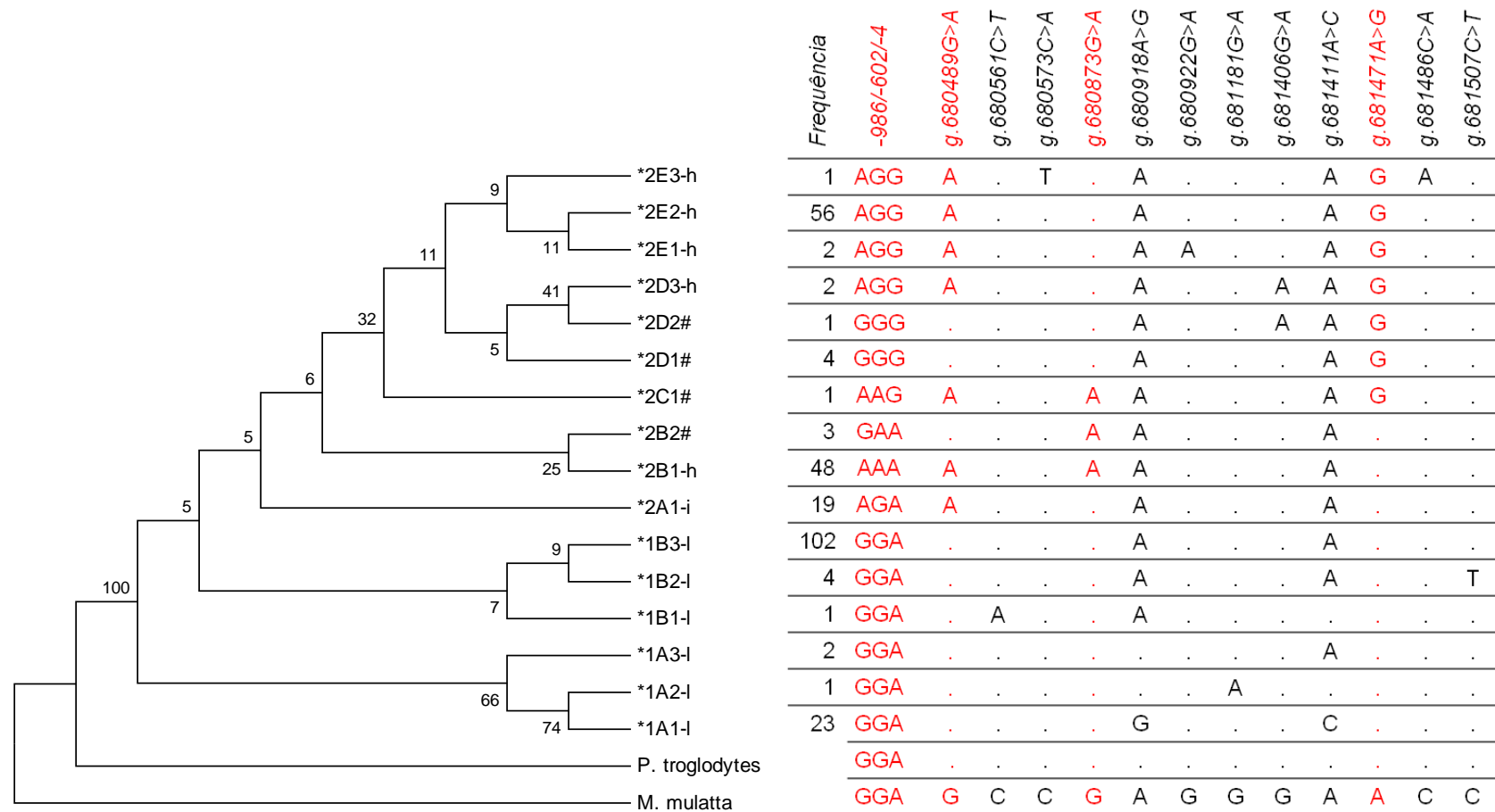
##### 4.2.6.1 Árvore Filogenética

A árvore filogenética obtida pelo método de máxima parcimônia com *bootstrap* dos haplótipos reconstruídos está ilustrada na figura 11. Observaram-se dois clados distintos de acordo com os SNPs -986 G>A, -602 G>A e -4 A>G intercalado por um clado central. O clado mais antigo é compreendido pelos haplótipos \*1A1-l, \*1A2-l, \*1A3-l, \*1B1-l, \*1B2-l e \*1B3-l que possuem o haplótipo -986/-602/-4 associado com os baixos níveis séricos de ficolina-2 (-986\*G/-602\*G/-4\*A). O clado central contém o haplótipo \*2A1-i (-986\*A/-602\*G/-4\*A), que está associado aos níveis intermediários de ficolina-2. O clado mais recente é representado pelos haplótipos \*2B1-h, \*2D3-h, \*2E1-h, \*2E2-h e \*2E3-h, os quais são constituídos por dois haplótipos -986/-602/-4 associados aos altos níveis séricos de ficolina-2 (-986\*A/-602\*A/-4\*A, mais antigo e -986\*A/-602\*G/-4\*G, mais recente) de acordo com a classificação dos níveis séricos de ficolina-2 descritos por

MUNTHE-FOG *et al.* (2007), RUSKAMP *et al.* (2008) e GARRED *et al.* (2009). Os haplótipos \*2B2, \*2C1, \*2D1 e \*2D2 foram considerados duvidosos devido à incongruência com os dados obtidos do desequilíbrio de ligação (item 4.2.3), nos quais não foram encontradas as combinações -986\*G/-602\*A, -986\*G/-4\*G e -602\*A/-4\*G. De acordo com Boldt *et al.* (2010), a reconstrução de haplótipos utilizando-se algoritmos ELB pode resultar em erros entre 1-2%. Com a exclusão dos haplótipos duvidosos, pode-se definir os possíveis passos mutacionais dos SNPs das posições -986, -602 e -4 (figura 12). Dessa forma, sugere-se que, a partir do haplótipo -986\*G/-602\*G/-4\*A, considerado mais antigo de acordo com a árvore filogenética, derivou-se o haplótipo -986\*A/-602\*G/-4\*A através de uma mutação G>A na posição -986. Dois eventos mutacionais subsequentes no haplótipo -986\*A/-602\*G/-4\*A, G>A na posição -602 e A>G na posição -4, podem ter dado origem aos haplótipos -986\*A/-602\*A/-4\*A e -986\*A/-602\*G/-4\*G, respectivamente. Além disso, observou-se uma possível seleção positiva dos haplótipos associados aos altos níveis séricos de ficolina-2, uma vez que este fenótipo potencialmente vantajoso é mais recente quando comparado com o haplótipo associado aos baixos níveis séricos de ficolina-2 na população humana.

#### 4.2.7 Correlação genótipo *versus* fenótipo de FCN2

De acordo com o teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, não houve diferença estatística ( $p=0,49$ ) entre as concentrações séricas de ficolina-2 verificadas entre os genótipos -986/-602/-4 AAA, ARR, RRR, RGA, GGA, RRA, AGG, RGR, ARA, GGG, AGR e GGR de 40 amostras sequenciadas para o promotor de FCN2, o que provavelmente se deve ao pequeno número amostral (Gráfico 9). Quando se assumiu a média teórica de 8.000 ng/ml (característica de altos níveis séricos) no teste WSRT (*Wilcoxon Signed Rank Test*), revelou-se um desvio significativo das concentrações séricas verificadas para os genótipos GGA ( $p=0,008$ ), RGR ( $p=0,016$ ) e RRA ( $p=0,031$ ). Este desvio é compatível com os dados da literatura de que a presença do nucleotídeo adenina (A) nas posições -986 e -602 e de guanina (G) na posição -4 está associada a altas concentrações de ficolina-2 no soro de maneira aditiva (MUNTHE-FOG *et al.*, 2007).



**FIGURA 11 – ÁRVORE FILOGENÉTICA E MUDANÇAS NUCLEOTÍDICAS DO PROMOTOR E PARTE INICIAL DO EXON 1 DO GENE *FCN2***  
 FONTE: O autor (2011)

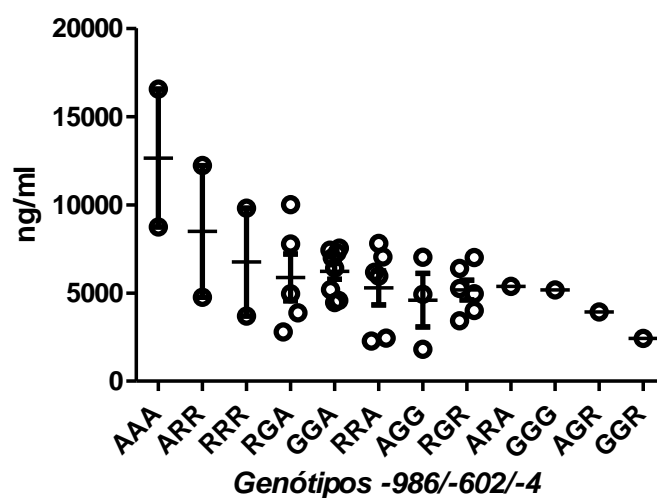
LEGENDA: # - haplótipos duvidosos; as associações dos haplótipos com os níveis séricos de ficolina-2 foram realizados segundo dados de Munthe-Fog *et al.* (2007), Ruskamp *et al.* (2008) e Garred *et al.* (2010); h – altos níveis séricos de ficolina-2; i – níveis séricos intermediários de ficolina-2; l – baixos níveis séricos de ficolina-2; Em vermelho – haplótipo -986/-602/-4.

NOTA: A nomenclatura dos haplótipos está de acordo com as normas propostas por Nebert (2002) e os SNPs estão com as denominações originais do dbSNP (NCBI, 2010a). As posições correspondentes aos SNPs estão dispostas na primeira linha e a sequência de referência (*M. mulatta*) está localizada na última linha.



**FIGURA 12 – PASSOS MUTACIONAIS DO HAPLÓTIPO -986/-602/-4.**  
 FONTE: O autor (2011)

NOTA: O haplótipo mais antigo é o GGA.



**GRÁFICO 9 – GENÓTIPOS -986/-602/-4 VERSUS CONCENTRAÇÃO SÉRICA DE FICOLINA-2**  
 FONTE: O autor (2011)

LEGENDA: Eixo Y – concentração de ficolina-2 (ng/ml); Eixo X – genótipos -986/-602/-4 de FCN2

## 5 CONCLUSÕES

A técnica de PCR-SSP biespecífica padronizada para os SNPs -986G>A, -602G>A e -4G>A do gene *FCN2* apresentou desempenho confiável quando comparada com técnicas de padrão ouro, como sequenciamento. A PCR-SSP apresenta vantagens adicionais como rapidez, economia, além de possibilitar o conhecimento da fase gamética dos haplótipos identificados. A PCR-SSP pode ser utilizada para confirmação de resultados obtidos por sequenciamento, uma vez que a reconstrução de haplótipos por algoritmos são passíveis de erros.

A distribuição genotípica, haplotípica e alélica dos SNPs investigados foi devidamente identificada para a população euro-brasileira, sendo que estes dados poderão ser utilizados em futuros estudos de associações com doenças relacionadas a distúrbios do sistema complemento.

Com base na análise filogenética, sugere-se que concentrações baixas de ficolina-2 representam o fenótipo mais antigo de *FCN2* na espécie humana. Os passos mutacionais dos SNPs -986 G>A, -602 G>A e -4 G>A e os resultados dos testes de neutralidade seletiva levam-nos a sugerir que o efeito carona pode ter ocorrido por seleção positiva dos SNPs -986 G>A, -602 G>A e -4 A>G, associados a altas concentrações de ficolina-2, ou através da expansão demográfica da população humana.

A correlação genótipo *versus* fenótipo nos indivíduos sequenciados identificou desvios significativos dos genótipos GGA, RGR e RRA com relação a média prevalente nas altas concentrações séricas de ficolina-2, porém evidenciou-se a necessidade de aumentar a amostragem e de realizar haplotipagem física por meio da PCR-SSP para confirmação dos achados.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 6 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.
- BARRETT, J. C. *et al.* Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. **Bioinformatics**, v. 21, n. 2, p. 263-265, 2005.
- BEIGUELMAN, B. Fatores Evolutivos. In: BEIGUELMAN, B. **Genética de populações**. Ribeirão Preto: SBG, 2008, 235 p.
- BOLDT, A. B. W. **Amplificação alélica por PCR multiplex (PCR-SSP multiplex)**. Curitiba: Laboratório de Imunopatologia Molecular, 2009. 30 slides, color.
- BOLDT, A. B. W. *et al.* Phylogenetic nomenclature and evolution of mannose-binding lectin (*MBL2*) haplotypes. **BMC Genetics**, v.11, n. 38, 2010.
- BOLDT, A. B. W.; GOELDNER, I.; MESSIAS-REASON, I. J. T. Clinical relevance of the lectin pathway of complement in rheumatic diseases. **Advances in Clinical Chemistry**. Aceito para publicação.
- CEDZYNSKI, M. *et al.* Extremes of L-ficolin concentration in children with recurrent infections are associated with single nucleotide polymorphisms in the FCN2 gene. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 150, p. 99–104, 2007.
- CHEN, X. *et al.* Single nucleotide polymorphisms of Ficolin 2 gene in Behçet's disease. **Journal of Dermatological Science**, v. 43, p. 201-205, 2006.
- ENDO, Y.; MATSUSHITA, M.; FUJITA, T. Role of ficolin in innate immunity and its molecular basis. **Immunobiology**, v. 212, p. 371-379, 2007
- FAIK, I. *et al.* Ficolin-2 levels and genetic polymorphisms of *FCN2* in malaria. **Human Immunology**, v. 72, n. 1, p. 74-79, 2011.

EXCOFFIER, L.; LISCHER, H. E. L. Arlequin suite ver 3.5: A new series of programs to perform population genetics analyses under Linux and Windows. **Molecular Ecology Resources**, v. 10, n. 3, p. 564-567, 2010.

FAY, J. C.; WU, C.-I. Hitchhiking under positive Darwinian selection. **Genetics**, v. 155, p. 1405-1413, 2000.

FELSENSTEIN, J. Confidence limits on phylogenies: An approach using the bootstrap. **Evolution**, v. 39, p. 783-791, 1985.

FU, Y. X.; LI, W.-H. Statistical tests of neutrality mutations. **Genetics**, v. 133, p. 693-709, 1993.

FUJITA, T. Evolution of the lectin-complement pathway and its role in innate immunity. **Nature Reviews Immunology**, v. 2, n. 5, p. 346-353, mai. 2002.

GARRED, P. *et al.* MBL2, FCN1, FCN2 and FCN3—The genes behind the initiation of the lectin pathway of complement. **Molecular Immunology**, v. 46, p. 2737-2744. 2009.

GARRED, P. *et al.* The genetics of ficolins. **Journal of Innate Immunology**, v. 2, p. 3-16, 2010.

GUO, S. W.; THOMPSON, E. A. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. **Biometrics**, v. 48, p. 361-372, 1992.

HARTL, D. L.; CLARK A. G.. **Princípios de genética de populações**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. 660 p.

HERPES, B. L. *et al.* Coding and non-coding polymorphisms in the lectin pathway activator L-ficolin gene in 188 Dutch blood bank donors. **Molecular Immunology**, v. 43, p. 851-855, 2006.



HOLMSKOV, U.; THIEL, S.; JENSENIUS, J. C. Collections and ficolins: humoral lectins of the innate immune defense. **Annual Review Immunology**, v. 21, p. 547-578, 2003.

HUMMELSHØJ, T. *et al.* Polymorphisms in the FCN2 gene determine serum variation and function of Ficolin-2. **Human Molecular Genetics**, v. 14, n. 12, p. 1651–1658, 2005.

HUMMELSHØJ *et al.* Functional SNPs in the human ficolin (FCN) genes reveal distinct geographical patterns. **Molecular Immunology**, v. 45, p. 2508-2520, 2008.

KIMURA, M. Evolutionary rate at the molecular level. **Nature**, v. 217, p. 624-626, 1968.

KIMURA, M; OHTA, T. The average number of generations until fixation of a mutant gene in a finite population. **Genetics**, v. 61, p. 763-771, 1969.

KING, J. L.; JUKES, T. H. Non-Darwinian evolution: Random fixation of selectively neutral mutations. **Science**, v. 164, p. 788-798, 1969.

KRARUP, A. *et al.* L-ficolin is a pattern recognition molecule specific for acetyl groups. **Journal of Biological Chemistry**, v. 279, p. 47513-47519, 2004.

LIBRADO, P.; ROZAS, J. DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. **Bioinformatics**, v. 25, p. 1451-1452, 2009.

MESSIAS-REASON, I. J. T.; KREMSNER, P. G.; KUN, J. F. J. Functional Haplotypes That Produce Normal Ficolin-2 Levels Protect against Clinical Leprosy. **Journal of Infectious Diseases**, v. 199, p. 801-804, 2009a.

MESSIAS-REASON, I. J. T. *et al.* Ficolin 2 (FCN2) functional polymorphisms and the risk of rheumatic fever and rheumatic heart disease. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 157, p. 395-399, 2009b.

MUNTHE-FOG, L. *et al.* The Impact of FCN2 Polymorphisms and Haplotypes on the Ficolin-2 Serum Levels. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 65, p. 383-392, 2007.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. O sistema complemento e a imunidade inata. In: MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2010a. p. 61-81.

MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. Falhas nos mecanismos de defesa do hospedeiro. In: MURPHY, K.; TRAVERS, P.; WALPORT, M. **Imunobiologia de Janeway**. Porto Alegre: Artmed, 2010b. p. 495-544.

NCBIa. **dbSNP**. Disponível em <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/projects/SNP/>>. Acesso em 10/11/2010b.

NCBIb. **BLAST**. Disponível em <<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em 15/02/2010a.

NEBERT, D.W. Proposal for an allele nomenclature system based on the evolutionary divergence of haplotypes. **Human Mutation**, v. 20, p. 463-472, 2002.

NG, P. M. *et al.* C-reactive protein collaborates with plasma lectins to boost immune response against bacteria. **EMBO Journal**, v. 26, p. 3431-3440, 2007.

RUSKAMP, J. M. *et al.* Exploring the role of polymorphisms in ficolin genes in respiratory tract infections in children. **Clinical & Experimental Immunology**, v. 155, p. 433-440, 2008.

SLATKIN, M.; EXCOFFIER, L. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the EM algorithm. **Heredity**, v. 76, p. 377-383, 1996.

TAJIMA, F. Evolutionary relationship of DNA sequences in finite populations. **Genetics**, v. 105, p. 437-460, 1983.

TAMURA, K. *et al.* MEGA4: Molecular Evolutionary Genetics Analysis (MEGA) software version 4.0. **Molecular Biology and Evolution**, v.24, p.1596-1599, 2007.

UITENBROEK, D. G. **SISA Fisher 2 by 5**. 1997. Disponível em: <  
<http://www.quantitativeskills.com/sisa/statistics/fiveby2.htm>> Acesso em: 23/11/2010.

## ANEXOS

ANEXO 1 –	REGIÕES DE HIBRIDAÇÃO DOS INICIADORES DA PCR-SSP NO PROMOTOR DO GENE <i>FCN2</i> .....	53
ANEXO 2 –	PROTOCOLO DE DOSAGEM PLASMÁTICA DE FICOLINA-2 (HK336).....	54
ANEXO 3 –	CÁLCULOS DAS REAÇÕES DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS -986/-602 ( <i>PROM12</i> ) E -602/-4 ( <i>PROM23</i> ).....	55

## ANEXO 1 – REGIÕES DO ACOPLAMENTO DOS INICIADORES DA PCR-SSP NO PROMOTOR DO GENE *FCN2*

LOCUS	NT_019501	9110 bp	Iniciadores
.	.	.	.
661	ccaagccatcttttctaggttccatatctgcatctccatggagcctgtgtcttccccaggt		
721	tcatccctggacctcatctgcatctggcatagccttaattaagtcttgagaggtctgccc		
781	taaacaccacggaacccgaggggggtcttaactagtcatagtctcaggaccacacatctc		
841	catggggcattgaaggaaaatccgatgggattttgtttctcgcgctggctttgctgggctgg		
901	ggtcacagttttaaataccttctactgatcttgccaaggaagaaggc [acctcggcatcccg		-986 Af/Gf
961	atggca/g] gcaggtggcaggggtgcggtgggtgtagtgggaggtgcagtgcgtggttccgtctc		
1021	tgggggcttttaggtatacggcctctgggggccacctgctactgtctctgtctctaacct		
1081	ggctcagtcgaaggcgagagtgacacctcaggccagctcttctccaaaaggcgaacacaa		
1141	ccactgaagtaagtccacagccatcctacaggtgggatgtctggcctcagggctcagggg		
1201	gttccctgggcccctaggagtgaattcacctactctcatcctccctacaggctaagcccc		
1261	tgcattcacactcaagggtctccccttcagatgtgtacctgggtcatagtccccaggtc		
1321	cccactct [tctctcctttccctcctgttc [g/a] tgtgcccctgtgctctacat] ctgccccag		-602 Af/Gf
1381	gaaacagtggacacacacgcattttcctctccttttcaccctggcagcctgcctggacct		-602 Ar/Gr
1441	catagtggcagtttccaagcctcctgaggagagtcccaagtctgctcatgatgtggtgag		
1501	ggttactgtgtaaggcccacaccagtggccccatgaccagccctggccatgaggactctag		
1561	gtattcggataaggagagagacctctttgaagcagaacatctttagcaaacccttcctt		
1621	gttccccgtttctcagctcatggtgacatctgctcaccgctgaacaaagggtgggagatgg		
1681	gcctgggctctttgcccaaggccacaagcaagtcagcctgttccctggaaggagaccgtc		
1741	cccctgcagggatgacagtcgcatgggatccccaaagggcggggggtagggagcagccc		
1801	tggagatgatctcgacctcctgctggcgtcaccaagcccgcggagaggaagcggctgtc		
1861	actcggaagatgagaaattggagtctgagggaggctggcttctctagccctataagaggg		
1921	caggcaccttttgaagcaaagACCAGA [A/GGAGATGGAGCTGGACAGAGC] TGTGGGGTCTCT		-4 Ar/Gr
1981	GGGCGCTGCCACCCTGCTGCTCTTTCTTCTGGGCATGGCCTGGGCTCTCCAGGCGGCAGA		
2041	CACCTGTCCAGGtaagggcactccagggcctcctcctggaacttctcgtccctgaaagc		
.	.	.	.

LEGENDA: f – iniciador direto; r – iniciador reverso.

NOTA: A sequência em destaque corresponde a parte da região promotora de *FCN2*, sendo que as letras em maiúsculo indicam a área delimitada pelo exon 1. As regiões de hibridação de cada iniciador estão coloridas com suas respectivas cores indicadas na coluna da direita, sendo que o SNP em verde (-602 G>A), é uma região comum de hibridação dos iniciadores -602 Af/Gf e Ar/Gr.

## ANEXO 2 – PROTOCOLO DE DOSAGEM PLASMÁTICA DE FICOLINA-2 (HK336)

Material: Plasmas armazenados a -70°C

- 1 – Diluição em 10x do plasma com o tampão de ligação de ficolina-2;
- 2 – Transferir 100 µl do padrão, amostras e controles, preferencialmente em duplicata, para seus respectivos poços;
- 3 – Aplicar a fita adesiva sobre a placa batê-la levemente para eliminar qualquer bolha de ar;
- 4 – Incubar a placa ou strips durante 1h a 37°C;
- 5 – Lavar o prato 4 vezes com o tampão de lavagem;
- 6 – Remover cuidadosamente o selante da placa;
- 7 – Esvaziar a placa por inversão, agitá-la dentro de uma pia e mantê-la invertida sobre folhas de papel;
- 8 – Adicionar 200 µl de tampão de lavagem em cada poço e esperar 20 segundos;
- 9 – Repetir os procedimentos 7 e 8 por 3 vezes;
- 10 – Esvaziar a placa e batê-la gentilmente sobre folhas de papel;
- 11 – Adicionar 100 µl do anticorpo biotinilado em cada poço;
- 12 – Cobrir a bandeja com a cobertura adesiva e incubar por 1h em temperatura ambiente;
- 13 – Repetir os procedimentos 7 e 8 por 3 vezes;
- 14 – Adicionar 100 µl do conjugado de estreptavidina ligada à peroxidase diluída em cada poço;
- 15 – Repetir o procedimento 12;
- 16 – Repetir os procedimentos 7 e 8 por 3 vezes;
- 17 – Adicionar 100 µl do substrato TMB em cada poço;
- 18 – Cobrir a bandeja com a cobertura adesiva e incubá-la por 20 a 30 minutos em temperatura ambiente e na ausência de luz solar;
- 19 – Adicionar 100 µl da solução de parada e misturar a solução através da movimentação circular da placa. Bater gentilmente a bandeja para a eliminação das bolhas de ar;
- 20 – Fazer a leitura do placa em 450 nm, dentro dos 30 minutos após a adição da solução de parada.

### ANEXO 3 – CÁLCULOS DAS REAÇÕES DE PCR PARA AMPLIFICAÇÃO DOS FRAGMENTOS -986/-602 (PROM12) E -602/-4 (PROM23)

PCR FCN2 PROM 12 (-986/-602)			
Reagentes	[Inicial]	[Final]	Vol. (ul)
Tampão (x)	10	1	1,5
Sol. Q (x)	5	0,85	2,55
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	0	0
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Primer -986 Af/Gf (uM)	10	0,2	0,3
Primer -602 Ar/Gr (uM)	10	0,2	0,3
Taq Brasileira	5	0,02	0,06
DNA			1
H <sub>2</sub> O			9,17
Total			15
Produtos esperados:	986Af/Gf -> -602Ar/Gr	374 pb	
Programa:	FCN2T1	66 - 63 - 61	

PCR FCN2 PROM 23 (-602/-4) MIX GA			
Reagentes	[Inicial]	[Final]	Vol. (ul)
Tampão (x)	10	1	1,5
Sol. Q (x)	5	0,15	0,45
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	0	0
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Primer -602 Af/Gf (uM)	10	0,2	0,3
Primer -4Ar/Gr (uM)	10	0,2	0,3
Primer HGHf (uM)	10	0,2	0,3
Primer HGHR (uM)	10	0,2	0,3
Taq Brasileira	5	0,02	0,06
DNA			1
H <sub>2</sub> O			10,67
Total			15
Produtos esperados:	602Af/Gf -> -4Ar/Gr	648 pb	
	HGHf -> HGHR	431 pb	
Programa:	FCN2T1	66 - 63 - 61	

PCR FCN2 PROM 23 (-602/-4) MIX AA			
Reagentes	[Inicial]	[Final]	Vol. (ul)
Tampão (x)	10	1	1,5
Sol. Q (x)	5	0	0
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	0,35	0,21
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Primer -602 Af/Gf (uM)	10	0,2	0,3
Primer -4Ar/Gr (uM)	10	0,2	0,3
Primer HGHf (uM)	10	0,2	0,3
Primer HGHR (uM)	10	0,2	0,3
Taq Brasileira	5	0,02	0,06
DNA			1
H <sub>2</sub> O			10,91
Total			15
Produtos esperados:	602Af/Gf -> -4Ar/Gr	648 pb	
	HGHf -> HGHR	431 pb	
Programa:	FCN2T1	66 - 63 - 61	

PCR FCN2 PROM 23 (-602/-4) MIX GG			
Reagentes	[Inicial]	[Final]	Vol. (ul)
Tampão (x)	10	1	1,5
Sol. Q (x)	5	0,15	0,45
MgCl <sub>2</sub> (mM)	25	0	0
dNTP (mM)	25	0,2	0,12
Primer -602 Af/Gf (uM)	10	0,3	0,45
Primer -4Ar/Gr (uM)	10	0,3	0,45
Primer HGHf (uM)	10	0,2	0,3
Primer HGHR (uM)	10	0,2	0,3
Taq Brasileira	5	0,02	0,06
DNA			1
H <sub>2</sub> O			10,37
Total			15
Produtos esperados:	602Af/Gf -> -4Ar/Gr	648 pb	
	HGHf -> HGHR	431 pb	
Programa:	FCN2T1	66 - 63 - 61	